

Université de Montréal

**Le stress protéotoxique : le prix à payer
pour la tolérance au soi immunitaire**

par
Charles St-Pierre

Programme de biologie moléculaire, option biologie des systèmes
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
en biologie moléculaire option biologie des systèmes

Mars 2018

© Charles St-Pierre, 2018

Résumé

Chez les vertébrés, le thymus représente l'unique site de développement de cellules T compétentes. Cependant, le thymus vieillit plus rapidement que la plupart des organes en raison d'une perte progressive des cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs). Cette dégénérescence prématurée du thymus, aussi appelée involution thymique, augmente la susceptibilité aux infections et aux maladies auto-immunes, mais altère également les réponses aux vaccins et la surveillance immunitaire des cellules cancéreuses. L'objectif de cette thèse était donc d'élucider les mécanismes contrôlant la maintenance à long terme des mTECs, ce qui permettrait de faciliter la conception de nouvelles stratégies pour renverser l'involution thymique et ultimement, rajeunir le système immunitaire. Les mTECs sont indispensables à l'établissement de la tolérance au soi immunitaire, un processus vital qui repose sur une propriété distinctive de ces cellules, soit l'expression génique promiscuitaire (EGP). Nous avons montré qu'en raison de l'EGP, les mTEC matures peuvent exprimer la quasi-totalité des gènes codant pour des protéines et ainsi induire une tolérance pour la plupart des antigènes présents dans l'organisme. Bien que l'EGP permette aux mTECs d'établir la tolérance au soi, nos résultats supportent un nouveau paradigme selon lequel le prix à payer pour l'EGP est une augmentation des taux de synthèse protéique et de la susceptibilité au stress protéotoxique dans les mTEC matures, qui ont besoin de l'immunoprotéasome (IP) pour atténuer ce stress. Notamment, nous avons démontré que la perte de l'IP cause un épuisement rapide des cellules souches de mTECs et que les souris dépourvues d'IP présentent une involution thymique accélérée et un syndrome auto-immun affectant plusieurs organes. Collectivement, nos travaux identifient l'IP comme un régulateur majeur de l'homéostasie des mTECs et proposent une cible biologique potentielle pour renverser l'atrophie thymique associée à l'âge.

Mots-clés: Thymus, cellules épithéliales thymiques, involution thymique, tolérance au soi immunitaire, expression génique promiscuitaire, immunoprotéasome, stress protéotoxique, auto-immunité.

Abstract

In all vertebrates, the thymus is the sole site where hematopoietic progenitors develop into functionally competent T cells. Notably, the thymus ages more rapidly than other organs because of a progressive loss of medullary thymic epithelial cells (mTECs). This so-called thymic involution increases the susceptibility to infections and autoimmune diseases and impairs response to vaccines and cancer immunosurveillance. Thus, the objective of this thesis was to elucidate the mechanisms controlling mTEC homeostasis *in vivo*, which would greatly facilitate the rational design of novel strategies for reversing thymic involution and ultimately, rejuvenate the immune system. The sole non-redundant role of mTECs is to induce self-tolerance, a vital process that depends on a unique feature of mTECs: promiscuous gene expression (pGE). We found that, because of pGE, mature mTECs can collectively express almost the entire repertoire of known protein-coding genes and thereby induce tolerance to most antigens expressed in the organism. While pGE is the key process enabling mTECs to establish self-tolerance, our results show that the price to pay for pGE is an increased protein biogenesis and higher susceptibility to proteotoxic stress in mature mTECs, which need immunoproteasomes (IPs) to mitigate this stress. Notably, we found that IP-deficiency leads to exhaustion of postnatal mTEC progenitors and that IP-deficient mice show accelerated thymic involution and multiorgan autoimmune manifestations. Taken together, our work identifies IPs as major regulators of mTEC homeostasis and provides a potential biological target for reversing age-dependent thymic atrophy.

Keywords: Thymus, thymic epithelial cells, thymic involution, self-tolerance, promiscuous gene expression, immunoproteasome, proteotoxic stress, autoimmunity.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Avant-propos.....	xviii
CHAPITRE 1	1
1. Introduction.....	2
1.1 Le thymus : site de production unique des lymphocytes T.....	3
1.1.1 Les lymphocytes T : des cellules clés de l'immunité adaptative	4
1.1.2 Évolution du thymus.....	7
1.1.3 Organogenèse du thymus.....	8
1.1.4 Principaux constituants du thymus	10
1.1.5 Les cellules épithéliales thymiques.....	12
1.1.5.1 Développement et différenciation des cellules épithéliales thymiques	14
1.1.5.2 Rôles des cellules épithéliales thymiques corticales.....	17
1.1.5.2.1 Développement initial des thymocytes	17
1.1.5.2.2 Sélection β des thymocytes $\alpha\beta$ classiques	20
1.1.5.2.3 Sélection positive.....	21
1.1.5.3 Rôles des cellules épithéliales thymiques médullaires	22
1.1.5.3.1 Sélection négative et développement des T_{reg}	22
1.1.5.3.2 Expression génique promiscuitaire	25
1.2 Involution thymique.....	28
1.2.1 Involution thymique âge-dépendante.....	29
1.2.1.1 Facteurs extrinsèques au thymus	31
1.2.1.1.1 Les hormones	31

1.2.1.1.2	Les progéniteurs hématopoïétiques.....	34
1.2.1.2	Facteurs intrinsèques au thymus	35
1.2.1.2.1	Sénescence cellulaire	36
1.2.1.2.2	Épuisement des cellules souches	37
1.2.1.2.3	Altérations génétiques et épigénétiques.....	38
1.2.1.2.4	Altérations dans la communication intercellulaire	40
1.2.1.2.5	Altérations du métabolisme bioénergétique.....	42
1.2.1.2.6	Perte de l'homéostasie des protéines	43
1.2.1.3	Rôles physiologiques à l'involution thymique	45
1.2.2	Involution thymique âge-indépendante.....	46
1.3	Objectifs de la thèse	47
1.3.1	Objectif général.....	47
1.3.2	Objectifs spécifiques.....	47
CHAPITRE 2		48
2. Differential features of AIRE-induced and AIRE independent promiscuous gene expression in thymic epithelial cells.....		
		49
2.1	Présentation de l'article #1.....	50
2.2	Contributions des auteurs.....	52
2.3	Abstract.....	53
2.4	Introduction.....	54
2.5	Material and Methods	56
2.5.1	Mice	56
2.5.2	Flow cytometry analyses and cell sorting.....	56
2.5.3	RNA extraction and cDNA libraries preparation.....	57
2.5.4	RNA-seq	57
2.5.5	Gene ontology analyses	58
2.5.6	Statistical and bioinformatics analyses	58
2.6	Results.....	59
2.6.1	Dynamics of TEC populations in WT and Aire-deficient mice	59
2.6.2	AIRE has non-cell autonomous effects on the cTEC transcriptome	61
2.6.3	Impact of AIRE on pGE	66

2.6.4	AIRE-induced versus –independent TRA	70
2.6.5	Tissue representation by AIRE-induced and –independent TRA.....	72
2.6.6	Biological processes regulated by promiscuously expressed genes	77
2.7	Discussion	80
2.8	Acknowledgments.....	82
2.9	Disclosures.....	82
2.10	References.....	83
2.11	Footnotes.....	91
2.12	Supplemental Data.....	92
CHAPITRE 3.....		96
3.	Immunoproteasomes control the homeostasis of medullary thymic epithelial cells by alleviating proteotoxic stress.....	97
3.1	Présentation de l'article #2.....	98
3.2	Contributions des auteurs.....	100
3.3	Summary	101
3.4	Highlights.....	102
3.5	eTOC Blurb.....	103
3.6	Introduction.....	104
3.7	Results.....	106
3.7.1	Mature mTECs synthesize more proteins than other cell types.....	106
3.7.2	IPs selectively regulate mTEC cellularity in a cell-autonomous manner ...	110
3.7.3	IP deficiency results in autoimmunity	114
3.7.4	Mature mTECs from IP-deficient mice have a reduced half-life	118
3.7.5	Defective regenerative capacity of adult mTECs in IP-deficient mice.....	122
3.7.6	IPs alleviate proteotoxic stress in mTECs	126
3.8	Discussion	130
3.9	Experimental Procedures	133
3.9.1	Mice	133
3.9.2	Flow cytometry and cell sorting	133
3.9.3	Measurement of protein synthesis	133
3.9.4	BrdU administration.....	134

3.9.5	Poly (I:C) treatment	134
3.9.6	Fetal thymic organ cultures.....	134
3.9.7	Statistical analysis.....	134
3.10	Accession Numbers	134
3.11	Author Contributions	135
3.12	Acknowledgements.....	135
3.13	References.....	136
3.14	Supplemental Information	142
3.14.1	Supplemental Figures.....	142
3.14.2	Supplemental Experimental Procedures	150
3.14.2.1	Mice	150
3.14.2.2	Flow cytometry and cell sorting	150
3.14.2.3	Measurement of protein synthesis	151
3.14.2.4	Immunoblotting analyses	151
3.14.2.5	Bone marrow chimeras	151
3.14.2.6	Histological analyses	152
3.14.2.7	Blood and urine analyses	152
3.14.2.8	RNA extraction.....	152
3.14.2.9	qPCR primers.....	153
3.14.2.10	Proteasome content.....	154
3.14.2.11	TEC colony-forming assay	154
3.14.2.12	Fetal thymic organ cultures.....	155
3.14.2.13	Thymus transplantations	155
3.14.3	Supplemental References.....	156
CHAPITRE 4	157
4.	Discussion.....	158
4.1	Impact de l'EGP au niveau transcriptionnel	159
4.1.1	Les mTEC matures ont un dosage génique augmenté.....	159
4.1.2	Les mTECs sont le miroir du soi immunitaire.....	161
4.1.3	Fonctions alternatives de l'EGP.....	163
4.2	Impact de l'EGP au niveau traductionnel	164

4.2.1	Les mTEC matures synthétisent plus de protéines	164
4.2.2	Régulation de la protéostasie chez les mTECs	165
4.3	L'IP est essentiel pour l'homéostasie des mTECs.....	169
4.3.1	L'IP contrôle la cellularité des mTECs.....	169
4.3.2	Les souris IP-déficientes développent un syndrome auto-immun	171
4.3.3	L'absence d'IP augmente la susceptibilité des mTECs à l'apoptose.....	173
4.3.4	Les mTECs IP-déficientes montrent un potentiel régénératif diminué suite à un stress thymique aigu.....	174
4.3.5	L'IP détermine le potentiel de différenciation des progéniteurs de mTECs	175
4.3.6	Les mTECs dépourvues d'IP activent un mécanisme adaptatif contre le stress protéotoxique	177
4.3.7	Le rôle de l'IP ne se limite pas à la production d'antigènes	180
4.3.8	Pertinences cliniques des découvertes	181
Conclusion		182
Bibliographie.....		183

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1.1 Modèle classique d'interaction entre le récepteur des cellules T et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.....	5
Figure 1.2 Développement embryonnaire du thymus	9
Figure 1.3 Origine développementale des principaux types cellulaires du thymus.....	11
Figure 1.4 Marqueurs phénotypiques et développementaux des TECs	13
Figure 1.5 Mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant le développement et la différenciation des TECs	16
Figure 1.6 Points de contrôle dans la différenciation des thymocytes.....	18
Figure 1.7 Interactions entre cTECs et thymocytes	19
Figure 1.8 Interactions entre mTECs et thymocytes.....	23
Figure 1.9 Contrôle de l'EGP par le régulateur auto-immun (AIRE).....	27
Figure 1.10 Activation de la réponse aux protéines mal-repliées (UPR).....	44

CHAPITRE 2

Figure 2.1 Flow cytometry analysis of TEC population in WT and Aire-deficient mice	60
Figure 2.2 RNA-seq of primary cTEC, mTEC ^{lo} and mTEC ^{hi} harvested from WT and Aire-deficient mice.....	62
Figure 2.3 Transcriptome of WT and Aire-KO cTEC	65
Figure 2.4 The transcriptome of WT vs. Aire-KO mTEC subsets reveal the breadth of pGE	68
Figure 2.5 Peripheral tissue representation of AIRE-induced and AIRE-independent TRA	73
Figure 2.6 Biological processes associated to AIRE-induced promiscuously expressed genes	79
Supplemental Figure 2.S1 Isotype controls for flow cytometry analysis	92
Supplemental Figure 2.S2 Flow cytometry analysis of TEC in WT and <i>Aire</i> -deficient mice	93
Supplemental Figure 2.S3 Bioinformatics analyses on the transcriptome of TEC populations.....	94
Supplemental Figure 2.S4 Identification of tissue-restricted antigens.....	95

CHAPITRE 3

Figure 3.1 Quantification of global protein synthesis in thymic cell populations in vivo	107
Figure 3.2 Impact of IP deficiency on TEC cellularity	112
Figure 3.3 Loss of IPs in mTECs leads to autoimmune manifestations	116
Figure 3.4 Developmental dynamics of mTECs in IP-deficient mice	120
Figure 3.5 Regenerative potential and mTEC progenitor activity in IP-deficient mice	124
Figure 3.6 IPs alleviate proteotoxic stress in mTECs	128
Supplemental Figure 3.S1, related to Figure 3.1 Analysis of puromycin incorporation in thymic cell populations	142
Supplemental Figure 3.S2, related to Figure 3.1 Influence of cell size and cell cycle status on protein synthesis.....	144
Supplemental Figure 3.S3, related to Figure 3.2 Expression of proteasome genes in various cell types.....	146
Supplemental Figure 3.S4, related to Figure 3.2 Impact of IP-deficiency on thymocyte development.....	147
Supplemental Figure 3.S5, related to Figure 3.5 Colony-forming assay with primary TECs isolated from WT and dKO mice.....	148
Supplemental Figure 3.S6, related to Figure 3.6 Phenotypic evaluation of TEC subsets in fetal thymic organ culture	149

CHAPITRE 4

Figure 4.1 AIRE contrôle l'expression de plus de 3,000 gènes promiscuitaires chez les mTEC matures	159
Figure 4.2 Mécanismes contrôlant la qualité du protéome	165
Figure 4.3 Différences majeures entre le CP et l'IP.....	167
Figure 4.4 Potentiel de différenciation des progéniteurs bipotents de TECs chez les souris dKO.....	175
Figure 4.5 Impact de l'IP sur la biologie des mTECs.....	179

Liste des abréviations

2dGuo	2'-deoxyguanosine
7-AAD	7-aminoactinomycine D
Ab	Anticorps
Ag	Antigène
ADN	Acide déoxyribonucléique
AIRE	Régulateur auto-immun
ANOVA	Analyse de la variance
APC	Cellule présentatrice d'antigène
APECED	Polyendocrinopathie-candidose-dystrophie ectodermale auto-immune
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
B6	Souris C57BL/6
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
CCL	Ligand de chimiokine à motif C-C
CCR	Récepteur de chimiokine à motif C-C
CD	Marqueur de différenciation
CFE	Efficacité à former des colonies
cGy	Centigray
CHX	Cycloheximide
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CP	Protéasome constitutif ou standard
cTECs	Cellules épithéliales thymiques corticales
CXCL	Ligand de chimiokine à motif C-X-C
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DCs	Cellules dendritiques
DEG	Gène différentiellement exprimé

dKO	Double <i>knockout</i> pour PSMB8 et PSMB10 de l'immunoprotéasome
DN	Thymocytes double négatif CD4 ⁻ CD8 ⁻
DP	Thymocytes double positif CD4 ⁺ CD8 ⁺
E	Jour embryonnaire
EC	Cellules épithéliales
EGP	Expression génique promiscuitaire
EIF2 α	Facteur d'initiation de la traduction des eucaryotes 2A
ENDO	Cellules endothéliales
EPCAM	Molécule d'adhésion des cellules épithéliales
FACS	Cytométrie en flux
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FIBRO	Fibroblastes
FOXN1	Protéine <i>forkhead box</i> N1
FOXP3	Protéine <i>forkhead box</i> P3
FTOC	Culture de thymus fœtal
GFP	Protéine fluorescente verte
GH	Hormone de croissance
GO	Ontologie de gènes
GVHD	Maladie du greffon contre l'hôte
HE	Marquage hématoxyline et éosine
HSP	Protéine de réponse au choc thermique
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IP	Immunoprotéasome
IRE1 α	<i>Inositol-requiring enzyme-1</i>
K5	Cytokératine 5
K8	Cytokératine 8
KI-67	Marqueur de prolifération cellulaire Ki-67
KO	<i>Knockout</i>
LMP	Polypeptide de petite masse moléculaire

LT β R	Récepteur à la lymphotoxine beta
MECL-1	Sous-unité du complexe endopeptidase multicatalytique 1
MFI	Intensité de fluorescence moyenne
miR	MicroARN
mRNA	ARN messenger
mTECs	Cellules épithéliales thymiques médullaires
mTEChi	Cellules épithéliales thymiques médullaires matures
mTEClo	Cellules épithéliales thymiques médullaires immatures
mTOR	Cible de la rapamycine des mammifères
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
NK	Cellule tueuse naturelle
NU	Souris nue athymique
P53	Protéine tumorale 53
PBS	Tampon phosphate salin
PERK	Protéine kinase <i>PKR-like</i> du réticulum endoplasmique
POLY(I:C)	Acide polyinosinique-polycytidylique
PSMA	Sous-unité alpha du protéasome
PSMB	Sous-unité beta du protéasome
PURO	Puromycine
S6	Protéine ribosomale S6
SP	Thymocytes simple positifs CD4 ⁺ CD8 ⁻ ou CD4 ⁻ CD8 ⁺
RANK	Récepteur activateur de NF- κ B
RNA-SEQ	Séquençage de l'ARN à haut débit
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPKM	<i>Reads per kilobase per million mapped reads</i>
RT-qPCR	Transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase quantitative
SD	Écart type
TCR	Récepteur de cellule T
TECs	Cellules épithéliales thymiques
TGF	Facteur de croissance transformant
TM	Tunicamycine

TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRA	Antigène tissu-spécifique
Treg	Cellule T régulatrice
UEA1	Lectine <i>Ulex europaeus</i> 1
UPR	Réponse aux protéines mal repliées
VDJ	Segments variables, de diversité et joignant
WT	Type sauvage
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>

Remerciements

Dans un premier temps, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr. Claude Perreault, pour m'avoir permis de développer mon plein potentiel en recherche biomédicale. Merci de votre engagement envers la relève scientifique et de votre passion contagieuse des sciences. Je me considère extrêmement chanceux d'avoir fait partie de votre équipe, grâce à laquelle j'ai pu acquérir une solide formation multidisciplinaire qui me suivra pendant toute ma carrière.

J'aimerais remercier Marie-Pierre, Caroline et Sylvie pour leur volonté à réaliser l'impossible pour l'avancement de nos recherches. Faisant également partie intégrante de cette formidable équipe, j'aimerais sincèrement remercier tous les étudiants et étudiantes avec qui j'ai eu le privilège de travailler et d'échanger pendant mon séjour dans le laboratoire Perreault. Notamment, merci à Krystel, Céline et Alexandre de votre soutien, vos suggestions et même vos critiques scientifiques, que j'ai toujours bien reçues, car vous êtes des personnes que j'estime énormément. Je me souviendrai toujours de nos discussions scientifiques et parfois très peu scientifiques, surtout pendant nos périodes de dîner, toujours parsemées de rires et d'émotions. Plus récemment, j'ai aussi eu la chance d'apprendre à connaître des personnes extraordinaires; merci à Leslie, Manon et Anca pour votre écoute et nos discussions toujours agréables.

J'aimerais aussi remercier tous les professionnels des plateformes scientifiques de l'IRIC pour leur dévouement et leurs judicieux conseils: Danièle Gagné, Gaël Dulude (cytométrie en flux), Micheline Fortin, Julie Hinsinger (histologie), Raphaëlle Lambert, Valérie Villeneuve (génomique), Isabelle Caron (animalerie), Karine Audette (criblage à haut débit) et Jean-Philippe Laverdure (bio-informatique). Merci d'avoir rendu le tout possible et d'avoir contribué à l'avancement de mes projets multidisciplinaires.

Merci à Julie Mantovani et Pascale Le Therizien (affaires académiques) d'avoir toujours pris le temps de me guider dans mes nombreuses démarches académiques. Vous faites un travail remarquable et en tant qu'étudiant, je vous en remercie.

Merci à tous les chercheur(e)s qui ont pris de leur précieux temps pour venir suivre mon cheminement académique lors de mes comités de suivi et de mon comité pré-doctoral: Trang Hoang, Pierrette Gaudreau, Étienne Gagnon, Élie Haddad, Françoise Le Deist et Constantin Polychronakos. Un merci spécial aux membres de mon comité de thèse pour votre engagement et votre participation: Trang Hoang, Pierrette Gaudreau, Serge Rivest et Francis Rodier.

Finalement, je souhaite remercier les organismes subventionnaires qui m'ont soutenu financièrement tout au long de mes études doctorales : le Fonds de recherche du Québec-Nature et Technologies, le Fonds de recherche du Québec-Santé, le programme de biologie moléculaire, la faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal et l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie.

Sur une note plus personnelle, j'aimerais remercier mes parents de leur support inconditionnel et leurs encouragements répétés tout au long de mes études. Finalement, j'aimerais remercier Kim, ma partenaire de vie et complice de tous les jours, pour son support inestimable depuis le tout début de mes études universitaires.

Avant-propos

La capacité du système immunitaire à prévenir les infections repose en grande partie sur le thymus, un organe aux fonctions essentielles et qui représente le centre de contrôle du système immunitaire. Notamment, c'est lors de leur séjour dans le thymus que les lymphocytes T immatures apprennent à distinguer le soi du non-soi. Or, cette étape de spécialisation des lymphocytes T est vitale pour assurer une protection efficace de l'organisme. Malgré cela, le thymus est l'organe qui vieillit le plus rapidement et il subit une perte programmée d'activité, ce qui réduit considérablement le nombre de lymphocytes T matures produits chaque jour. Les travaux de recherche présentés dans cette thèse visent donc à identifier les facteurs étiologiques responsables de cette atrophie prématurée du thymus. Plus précisément, nous avons étudié la biologie des cellules de l'épithélium thymique, une composante fonctionnelle essentielle du thymus.

La présente thèse est divisée en quatre chapitres. Le premier chapitre est une introduction générale visant à décrire les concepts clés entourant nos travaux de recherche en plus de définir les objectifs au projet de recherche. Le second chapitre est constitué d'un premier article publié décrivant les mécanismes transcriptionnels qui permettent aux cellules de l'épithélium thymique d'induire la tolérance au soi immunitaire. Le troisième chapitre est constitué d'un deuxième article publié qui décrit comment l'établissement de la tolérance au soi représente un fardeau majeur pour la maintenance à long terme de l'épithélium thymique. Le quatrième chapitre est consacré à la discussion des résultats présentés dans les chapitres 2 et 3. Des perspectives futures à nos travaux de recherche sont également présentées dans ce dernier chapitre.

CHAPITRE 1

1. Introduction

Il y a environ 500 millions d'années, le système immunitaire a connu un saut évolutif considérable entraînant l'apparition du système immunitaire adaptatif. Chez les vertébrés, ce système agit notamment comme un pare-feu contre les agents envahisseurs (pathogènes) et permet une surveillance étroite des cellules anormales de l'organisme. De plus, le dogme actuel maintient que le système immunitaire adaptatif permet aux vertébrés de vivre un style de vie multi-organismique, c'est-à-dire en constante cohabitation avec d'autres formes de vie (bactéries, virus). Ce système est hautement hiérarchisé et compartimenté en plusieurs populations de cellules immunitaires exerçant des fonctions décisives. Nous nous sommes plus particulièrement intéressé au développement des lymphocytes T, des cellules clés de l'immunité adaptative. Depuis l'émergence du système immunitaire adaptatif, les lymphocytes T ont dû développer des stratégies de reconnaissance efficaces afin de discriminer les cellules normalement présentes dans l'organisme (le soi) et les cellules infectées ou néoplasiques (le non soi). Nous traiterons donc du fait que, pour assurer leur survie, les vertébrés doivent absolument apprendre à distinguer le soi du non soi. Or, l'établissement de la tolérance au soi immunitaire se produit dans le thymus, un organe indispensable pour le développement des lymphocytes T. Il n'existe aucun organe dans le règne animal qui peut se substituer au thymus. Néanmoins, le thymus est l'organe qui vieillit le plus rapidement chez les vertébrés et ce phénomène, aussi appelé involution thymique, pose problème chez les individus vieillissants. Notamment, la dégénérescence prématurée que subit le thymus avec l'âge augmente la susceptibilité aux infections et aux maladies auto-immunes et altère les réponses aux vaccins ainsi que la surveillance immunitaire des cellules cancéreuses. Nos travaux de recherche visent donc à élucider les mécanismes contrôlant la maintenance à long terme des cellules de l'épithélium thymique, ce qui permettrait de faciliter la conception de nouvelles stratégies pour prévenir le vieillissement du thymus.

1.1 Le thymus : site de production unique des lymphocytes T

La discrimination entre les constituants de l'organisme (le soi) et les agents envahisseurs (le non-soi) est un processus vital chez les organismes multicellulaires, car il représente un concept clé gouvernant les défenses immunitaires^{1,2}. Chez les vertébrés à mâchoires, la fonction immunitaire est partagée entre deux systèmes distincts mais hautement coordonnés, soit l'immunité innée et l'immunité adaptative³. Les véritables maîtres d'œuvre de ces réponses immunitaires sont les globules blancs présents dans la circulation périphérique, aussi appelés leucocytes (granulocytes, monocytes, lymphocytes)^{4,5}. Ces cellules sont issues de l'hématopoïèse, un processus physiologique assurant la formation de toutes les composantes cellulaires du sang (leucocytes, érythrocytes, plaquettes)⁶. D'un point de vue évolutif, l'immunité innée représente la ligne de défense immédiate la plus ancienne contre les agents envahisseurs. Lorsque les barrières physiques et biologiques de l'organisme ne peuvent empêcher l'entrée d'un agent infectieux, les leucocytes de la réponse innée sécrètent des médiateurs inflammatoires et chimiques qui recrutent davantage de cellules immunitaires aux sites d'infections⁷. En plus de pouvoir identifier et éliminer les agents envahisseurs de façon générique, certaines cellules de la réponse innée peuvent activer le système immunitaire adaptatif, dont la pierre angulaire est les lymphocytes³. Bien qu'il existe une multitude de populations lymphocytaires avec des fonctions effectrices différentes, les lymphocytes B et T sont les sous-types clés. L'immunité adaptative diffère de l'immunité innée pour trois aspects principaux. Premièrement, les lymphocytes reconnaissent les agents envahisseurs avec un haut degré de spécificité⁸. De plus, les lymphocytes font partis d'un répertoire somatiquement diversifié, ce qui offre un avantage définitif pour la détection du non-soi⁹. Finalement, les lymphocytes confèrent une immunité à long terme (mémoire immunologique) qui demeure efficace lors d'une réexposition subséquente au même agent étranger¹⁰. Dans nos efforts de mieux comprendre les mécanismes régissant le fonctionnement du système immunitaire adaptatif, nous nous sommes intéressés davantage aux lymphocytes T. Or, alors que la maturation de la majorité des cellules hématopoïétiques survient dans la moelle osseuse, le développement des lymphocytes T requière un site spécialisé, soit le thymus¹¹.

1.1.1 Les lymphocytes T : des cellules clés de l'immunité adaptative

Les lymphocytes B et T reconnaissent le non-soi via leurs récepteurs antigéniques somatiquement diversifiés¹². Pour les lymphocytes B, il s'agit d'un récepteur de type immunoglobuline, sous forme membranaire ou sécrété, qui neutralise et qui mène à l'élimination des agents envahisseurs circulants. Quant à eux, les lymphocytes T expriment de façon clonale un récepteur antigénique membranaire appelé récepteur des cellules T (TCR). Contrairement aux immunoglobulines qui reconnaissent les antigènes extracellulaires sous forme natifs, le TCR reconnaît des fragments de protéines (peptides) produits par protéolyse intracellulaire¹³. La biogenèse du TCR est un processus complexe qui requière plusieurs étapes de contrôle de la qualité dans le thymus. Le TCR est composé de chaînes CD3 et d'une chaîne α et β (majorité des lymphocytes) dont les portions extracellulaires hypervariables portent la spécificité antigénique¹⁴. Pour chaque cellule T individuelle, ces domaines extracellulaires variables sont assemblés de façon aléatoire par un événement de recombinaison génétique somatique appelé recombinaison VDJ¹⁴. Ce processus survient pendant les étapes de différenciation initiale des lymphocytes T dans le thymus et il dépend de l'action d'enzymes de type recombinase (RAG1 et RAG2). Ces enzymes joignent arbitrairement les différents segments des gènes TCR variables qui détermineront la structure de liaison à l'antigène, ce qui augmente considérablement la diversité antigénique¹⁵. Ainsi, chaque TCR possède une spécificité antigénique unique. Toutefois, la nature aléatoire de l'assemblage des chaînes TCR présente un risque non-négligeable : il est possible que le TCR exprimé à la surface d'un lymphocyte T soit auto-réactif, c'est-à-dire qu'il réagisse contre le soi immunitaire¹⁶.

Afin de bien comprendre cette ambivalence, il est nécessaire de définir les bases moléculaires du soi immunitaire. Pour un lymphocyte T, l'identité immunitaire (soi ou non-soi) est portée par des complexes protéiques composés de courts peptides antigéniques liés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)¹⁷. Or, il existe deux types de molécules du CMH : les CMH de classe I (CMH I) et les CMH de classe II (CMH II)¹⁸. Les lymphocytes T CD8 reconnaissent le soi immunitaire via l'interaction de leur TCR avec les complexes peptides-CMH I (immunopeptidome) présents à la surface de la quasi-totalité des cellules de l'organisme (Figure 1.1)¹⁸. Or, la composition de

CD4 ou CD8 qui stabilisent cette interaction. APC, cellules présentatrices d'antigènes. Reproduit avec la permission de *Nature Publishing Group* (Gascoigne²³).

Les lymphocytes T opèrent de manière autoréférentielle, c'est-à-dire qu'ils ont la capacité de reconnaître et de tolérer le soi tout en reconnaissant et réagissant fortement contre le non-soi²⁴. Cette compétence est façonnée dans le thymus où les lymphocytes T (aussi appelés thymocytes à ce stade) avec un TCR non fonctionnel ou auto-réactif sont éliminés²⁵. En périphérie (i. e., hors du thymus), l'affinité du TCR pour un complexe peptide-CMH a un impact direct sur la modulation de l'activité des lymphocytes T. Suite à l'interaction physique entre un TCR de haute affinité et un complexe peptide-CMH, le TCR transmet le signal au niveau intracellulaire via une cascade de signalisation impliquant des corécepteurs (CD4, CD8) et une pléthore de médiateurs de la transduction du signal (LCK, FYN, CD45, ZAP70)²⁶. Le résultat net de cet événement biochimique est une activation de facteurs de transcription clés qui modifient le programme d'expression génique des lymphocytes T²⁶. Les lymphocytes T passent alors d'un phénotype naïf (avant l'exposition antigénique) à un phénotype activé²⁷. Il s'en suit alors une expansion clonale majeure accompagnée d'une mobilisation des lymphocytes T vers les organes lymphoïdes primaires (rate) et secondaires (ganglions lymphatiques)²⁸.

Plusieurs mutations inactivantes ou hypomorphes affectant des gènes essentiels à l'homéostasie et au fonctionnement des lymphocytes T ont été reconnues comme étant la cause de maladies de type immunodéficience primaire chez l'humain²⁹. L'importance des lymphocytes T pour la compétence immunitaire peut être accentuée par le fait que les patients avec ces conditions héréditaires présentent de nombreuses manifestations cliniques: infections opportunistes, inflammation systémique, auto-immunité et risque accru au développement de cancer²⁹. De plus, n'eut été des progrès remarquables en transplantation de cellules souches hématopoïétiques pour traiter ces désordres immunologiques, la survie de ces patients immunodéficients serait sans doute davantage compromise²⁹. Ainsi, ces cas cliniques d'immunodéficience témoignent d'un élément capital : afin de maintenir nos défenses immunitaires actives et de les contrôler adéquatement, nous ne pouvons pas nous dispenser des lymphocytes T.

1.1.2 Évolution du thymus

Afin de devenir fonctionnellement compétent, les lymphocytes T doivent obligatoirement séjourner dans le thymus. Or, le thymus est l'organe lymphoïde primaire le plus ancien chez les vertébrés, des espèces multicellulaires qui dérivent d'un ancêtre commun ayant vécu il y a environ 500 millions d'années¹¹. La présence anatomique du thymus coïncide avec l'émergence du système immunitaire adaptatif et des structures analogues au thymus sont donc retrouvées chez toutes les espèces de vertébrés à mâchoires³⁰. Bien que la fonctionnalité et la morphologie générale du thymus soient hautement conservées, l'origine développementale et le site anatomique du thymus peuvent varier entre certaines espèces de vertébrés. Par exemple, des évidences anatomiques montrent que certaines espèces primitives de poissons sans mâchoires (larves de lamproie) possèdent des structures lympho-épithéliales dispersées qui sont équivalentes au thymus³¹. Chez les mammifères, le thymus dérive de l'endoderme pharyngé et est donc localisé dans la région thoracique, en juxtaposition avec le pharynx³⁰. Le développement de lymphocytes T matures à partir de précurseurs hématopoïétiques repose sur des signaux moléculaires précis produits par l'épithélium thymique. Pour que l'épithélium thymique se forme et devienne un microenvironnement thymopoïétique, le gène *forkhead box N1* (*Foxn1*) doit absolument être exprimé par les cellules épithéliales thymiques (TECs)³². Or, la spécification des TECs semble également être un processus conservé dans l'évolution. En effet, les espèces de vertébrés les plus anciennes expriment le gène *Foxn4*, une version ancestrale du gène *Foxn1*³³.

Ces analyses phylogénétiques montrent donc qu'une pression évolutive considérable existe afin de conserver la structure et la fonction du thymus. De plus, ces travaux identifient l'épithélium thymique comme la pierre d'assise de l'activité thymopoïétique chez plusieurs espèces distantes de vertébrés.

1.1.3 Organogenèse du thymus

Le thymus est un organe bi-lobaire situé au centre de la cavité thoracique juste au-dessus du cœur. Le premier rudiment du thymus émerge à partir de cellules de la troisième poche pharyngée de l'endoderme, une structure anatomique temporaire présente en paire sur les surfaces du pharynx (Figure 1.2)³⁴. Au jour embryonnaire 10.5 chez la souris, l'épithélium thymique commence à se développer en cohésion avec le primordium des glandes parathyroïdes³⁴. Ces ébauches d'organes sont entourées d'une capsule de cellules mésenchymateuses dérivées de la crête neurale et essentielles à l'organogenèse du thymus³⁵. Contrairement aux organes dérivés de l'endoderme postérieur (trachée, poumon, foie, pancréas) qui demeure reliés au tube digestif, les lobes thymiques se détachent du pharynx et se rejoignent à leur site anatomique final (Figure 1.2)³⁴. Bien qu'extrêmement rare chez l'humain, certaines espèces possèdent un thymus thoracique ainsi qu'un thymus cervical ayant suivi le trajet de migration des glandes parathyroïdes³⁶. Le thymus devient réceptif à l'entrée de précurseurs lymphoïdes au jour embryonnaire 11.5 chez la souris. Cette colonisation précoce du thymus dépend du gradient de concentration de nombreuses chimiokines (CXCL12, CCL21, CCL25) produites par l'épithélium thymique³⁷. Le facteur de transcription FOXP1 est le marqueur définitif du thymus et il est essentiel à la prolifération et la différenciation des TECs³⁸. Bien que l'expression de FOXP1 soit détectable à partir du jour embryonnaire 11 chez la souris, plusieurs autres facteurs de transcription (EYA1, HOXA3, PAX1/9, SIX1, TBX1) et réseaux de signalisation (SHH, BMP, WNT, FGF) sont nécessaires pour le développement du thymus. Des mutations dans la plupart de ces gènes mène à une hypoplasie thymique sévère³⁶. Chez l'humain, le syndrome DiGeorge représente sans doute l'exemple clinique le plus frappant de malformation du thymus. Les individus avec une délétion hétérozygote du gène *TBX1* ont un développement altéré des poches pharyngées et présentent une hypoplasie parathyroïdienne et une absence complète de thymus³⁶. De façon analogue, le syndrome Pignata Guarino, caractérisé par une mutation du gène *FOXP1*, mène également à un défaut congénital du développement thymique et une déficience marquée en lymphocytes T matures³⁹. Ces phénotypes peuvent également être reproduits chez la souris, car les animaux avec une inactivation sélective du gène *Tbx1* ou *Foxp1* sont aussi athymiques³⁶.

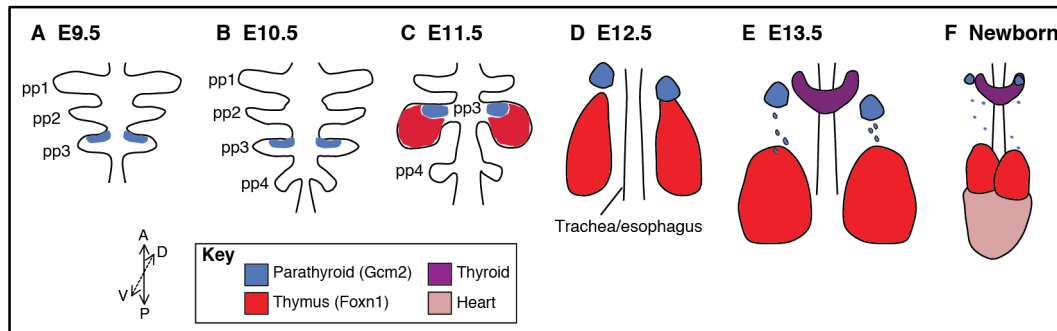


Figure 1.2 | Développement embryonnaire du thymus. (A) Les poches pharyngées (pp) se forment de façon séquentielle sur les surfaces latérales de l'intestin antérieur et la pp3 se forme à partir du jour embryonnaire (E) 9.5. L'expression de Gcm2 (bleu) marque les glandes de la parathyroïde. (B) La pp4 se forme au jour E10.5 et (C) au jour E11.5, la pp3 se développe en un primordium prêt à se détacher du pharynx. À ce stade, le primordium est composé d'un rudiment du thymus (rouge) et de la parathyroïde (bleu) révélé par l'expression de Foxn1 et Gcm2, respectivement. (D, E) Pendant la période E12.5-13.5, le primordium se détache du pharynx et les glandes parathyroïdes se séparent des lobes thymiques. (F) Au stade périnatal, le thymus (rouge) est à sa position anatomique finale, tel qu'illustré par rapport à la glande thyroïde (mauve) et au cœur (rose). Les axes développementaux sont indiqués par des flèches : antérieur (A), postérieur (P), dorsal (D) et ventral (V). Reproduit avec la permission de *The Company of Biologists Ltd* (Gordon et Manley³⁴).

1.1.4 Principaux constituants du thymus

Le thymus est composé de deux types cellulaires qui peuvent être distingués par l'expression du marqueur CD45 : les cellules hématopoïétiques (CD45⁺) et les cellules stromales thymiques (CD45⁻) (Figure 1.3). Ces cellules sont distribuées dans deux zones morphologiques séparées qui possèdent des fonctions distinctes, soit le cortex et la médulla thymique³⁶. Au sein du thymus, les cellules de la lignée hématopoïétique comprennent les thymocytes en développement, les cellules B thymique ainsi que les DCs et les macrophages. Quant au stroma thymique, il est défini comme la composante non-hématopoïétique du thymus et il contient plusieurs types cellulaires qui forment la charpente structurelle grâce à laquelle les thymocytes vont transiter et se différencier⁴⁰. Le stroma thymique comprend un compartiment épithélial (cytokeratine⁺) et un autre d'origine non-épithéliale (cytokeratine⁻). Les cellules stromales thymiques non-épithéliales incluent les cellules endothéliales formant la vascularisation du thymus, les cellules du tissu connectif ainsi que les cellules mésenchymateuses et fibroblastes, qui produisent des molécules capitales au maintien de l'épithélium thymique (Figure 1.3)³⁶. Quant à elle, les TECs établissent les gradients de chimiokines nécessaires à la migration des thymocytes, produisent des ligands essentiels à la spécification cellulaire vers la lignée des lymphocytes T et déterminent la nature des récepteurs antigéniques exprimés à la surface des thymocytes⁴¹. En plus de contenir un mélange hétérogène de cellules, la composition cellulaire du stroma thymique varie avec l'âge. Notamment, l'espace occupé par l'épithélium thymique, la composante essentielle du thymus, diminue avec l'âge et est remplacé par d'autres types cellulaires⁴².

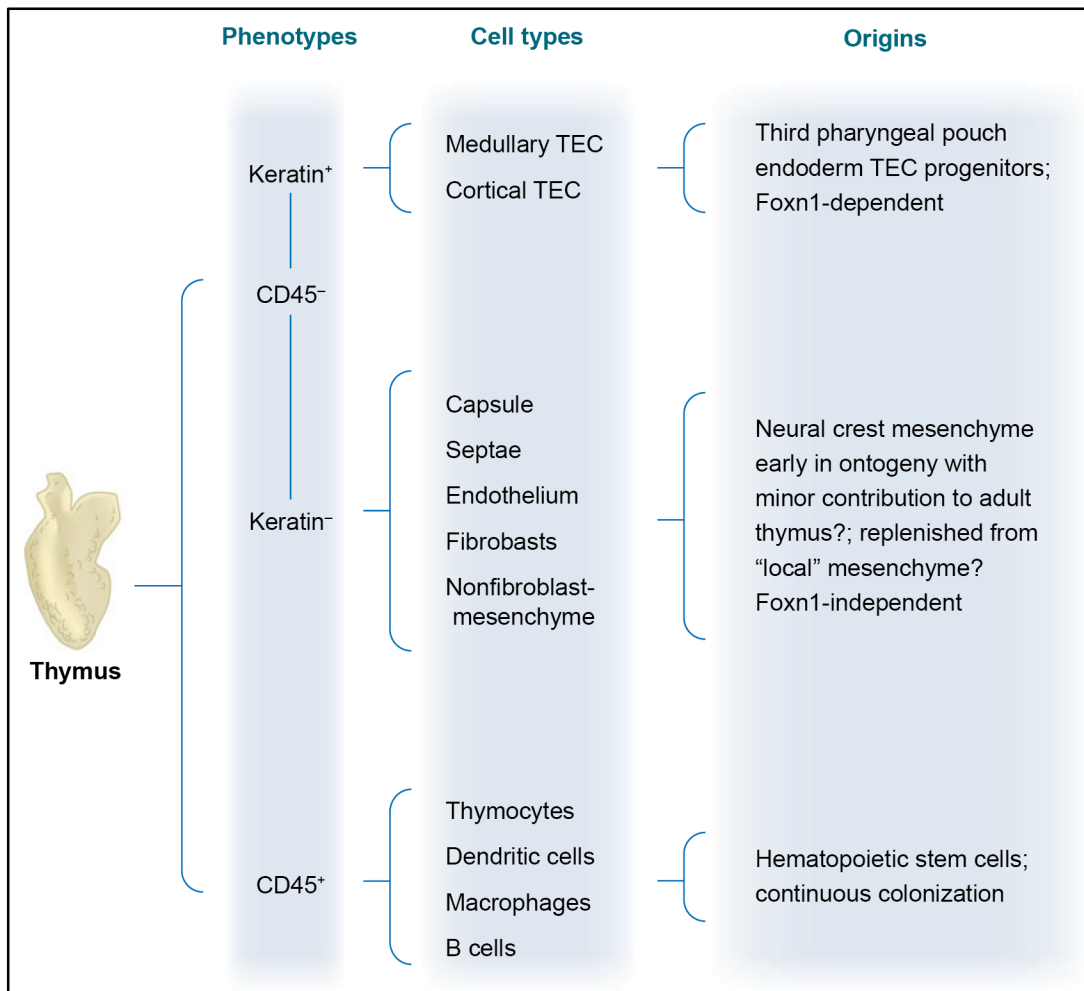


Figure 1.3 | Origine développementale des principaux types cellulaires du thymus. Le thymus peut être divisé en cellules hématopoïétiques (CD45⁺) et en cellules stromales (CD45⁻). Les cellules CD45⁻ comprennent les TECs (cytokératine⁺), qui origines de l'endoderme pharyngée et diverses populations de cellules mésenchymateuses hétérogènes (cytokératine⁻), qui contribue à des structures du thymus comme la capsule et la vascularisation. Le ratio de cellules CD45⁺ sur CD45⁻ est d'environ 50 pour 1. Toutefois, la plupart des populations rares de cellules thymiques peuvent être isolées par marquage phénotypique de suspensions cellulaires obtenues par digestion enzymatique du thymus. Reproduit avec la permission de *Annual Reviews* (Rodewald³⁶).

1.1.5 Les cellules épithéliales thymiques

Le thymus est essentiel au développement de lymphocytes T classiques. Notamment, le microenvironnement thymique attire les progéniteurs hématopoïétiques, assure leur spécification vers la lignée des lymphocytes T et coordonne une série d'étapes de différenciation menant à la production de lymphocytes T matures qui expriment un TCR fonctionnel et tolérant au soi³⁸. Cette activité thymopoïétique repose sur une rare population cellulaire du stroma thymique : les cellules épithéliales thymiques (TECs)³². Deux lignées principales de TECs sont retrouvées dans le thymus : les TECs corticales (cTECs) et médullaires (mTECs). Ces cellules résident dans des zones morphologiques séparées dans le thymus et elles peuvent être définies selon leur patron d'expression de plusieurs molécules essentielles à leur fonction (cytokines, chimiokines, molécules de co-stimulation, machineries de présentation antigénique et facteurs de transcription) (Figure 1.4)³⁸. Or, en plus d'être ségrégué au point de vue morphologique, les cTECs et les mTECs interviennent dans la différenciation des thymocytes à des moments différents. En effet, le séjour des thymocytes dans le thymus débute par des interactions avec les cTECs, qui contrôlent les étapes de différenciation initiales des thymocytes, alors que les mTECs jouent un rôle capital dans les étapes finales de maturation des thymocytes³⁸. En conséquence, les cTECs et les mTECs vont donc interagir avec des thymocytes qui ont un phénotype différent. Alors que les cTECs contrôlent la transition des thymocytes du stade $CD4^-CD8^-$ double négatif (DN) au stade $CD4^+CD8^+$ double positif (DP), les mTECs coordonnent le développement des thymocytes $CD4^+CD8^-$ et $CD4^+CD8^+$ simple positif (SP) ainsi que des cellules T régulatrices $CD4^+Foxp3^+$ (T_{reg})⁴³. L'origine développementale des TECs est un aspect hautement débattu de la biologie du thymus. Toutefois, plusieurs évidences ont démontré que le thymus embryonnaire contient des progéniteurs bipotents qui ont des origines de l'endoderme et qui sont capables de générer des cTECs et des mTECs^{44,45}. Cependant, le phénotype des progéniteurs bipotents qui dominent au stade embryonnaire est différent du phénotype retrouvé chez l'adulte (Figure 1.4). Chez l'adulte, la hiérarchie des progéniteurs de TECs est particulièrement complexe et ces cellules ont des phénotypes extrêmement diversifiés⁴⁶. De plus, il demeure incertain si la maintenance homéostatique de l'épithélium thymique repose davantage sur des progéniteurs bipotents ou unipotents.

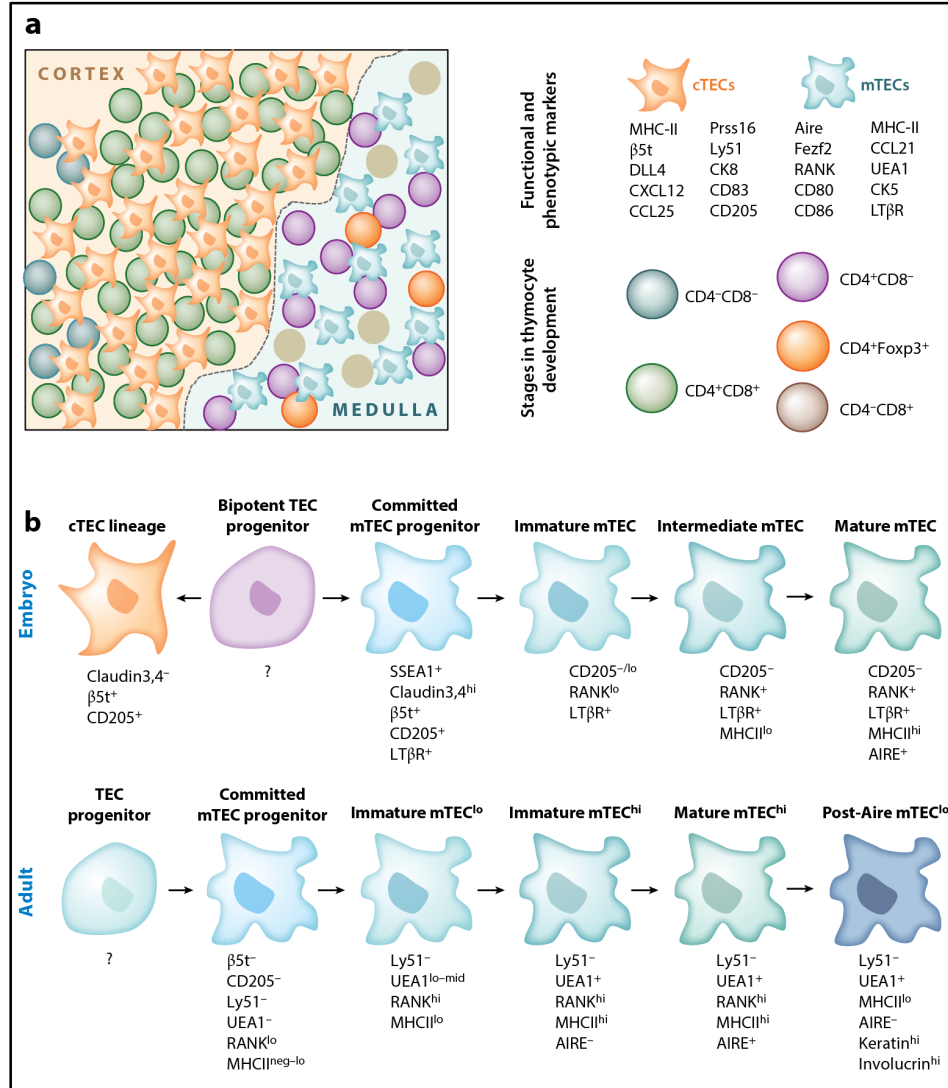


Figure 1.4 | Marqueurs phénotypiques et développementaux des TECs. (A) Le thymus adulte est composé d'une région corticale externe et d'une région médullaire interne formées par différentes populations cellulaires. Dans le cortex, le réseau de cTECs (orange) permet de multiples interactions avec les thymocytes immatures CD4⁻CD8⁻ double négatif (DN) et CD4⁺CD8⁺ double positif (DP). Dans la médulla thymique, les mTECs (bleu) interagissent avec les thymocytes CD4⁺CD8⁻ et CD4⁻CD8⁺ simple positif (SP) et les cellules T régulatrices CD4⁺Foxp3⁺ (T_{reg}). (B) Étapes du développement des TECs au stade embryonnaire (haut) et adulte (bas). La caractérisation moléculaire des progéniteurs de TECs adultes est différente de chez l'embryon et elle demeure hautement débattue dans la littérature. Reproduit avec la permission de *Annual Reviews* (Abramson et Anderson³⁸).

1.1.5.1 Développement et différenciation des cellules épithéliales thymiques

Les cTECs et les mTECs se développent à partir d'un progéniteur bipotent commun au stade embryonnaire³⁸. Or, certains facteurs de transcription (EYA1, PAX1/9, HOXA3, TBX1) impliqués dans l'organogenèse du thymus demeurent fortement exprimés chez les TECs postnatales immatures³⁸. Cependant, en participant au développement des TECs pendant les périodes prénatales et postnatales, le facteur de transcription FOXN1 est le plus important pour l'homéostasie et l'identité cellulaire des TECs (Figure 1.5)⁴⁷. Ce facteur de transcription se lie, via des sites consensus à l'ADN, à des gènes cruciaux pour la fonction des TECs (*Cxcl12*, *Ccl25*, *Dll4*, *Psmb11*, *Cd83*)⁴⁸. Or, ces gènes agissent à des étapes capitales du développement des thymocytes : (1) l'attraction et la migration des thymocytes, (2) la spécification cellulaire vers la lignée des lymphocytes T et (3) l'interaction entre le TCR des thymocytes et les complexes peptides-CMH⁴⁸. Pour ces raisons, l'expression du gène *Foxn1* est essentielle pour le maintien de l'activité thymopoïétique des TECs. Notamment, l'expression de *Foxn1* est contrôlée par des signaux extrinsèques (BMP4, WNT) dont la transduction intracellulaire du signal permet d'activer le programme transcriptionnel en aval de FOXN1⁴⁹⁻⁵³. L'identité épithéliale des TECs repose également sur l'activité d'autres régulateurs de la transcription (CBX4, TP63) impliqués dans le maintien de l'homéostasie chez plusieurs lignées de cellules épithéliales. L'inactivation de ces gènes chez la souris mène à un phénotype similaire, caractérisé par une réduction abrupte du nombre TECs, probablement causé par un potentiel prolifératif diminué des cellules souches de TECs⁵⁴⁻⁵⁶. Le développement des TECs est également contrôlé par les microARN. En effet, l'inactivation du complexe enzymatique essentiel à la biogenèse des microARN (Dicer) mène à une hypoplasie thymique sévère ainsi qu'à des changements architecturaux majeurs^{57,58}. Aussi, le développement des TECs est contrôlé par des signaux d'origine non-épithéliales (facteur de croissance des fibroblastes (FGF) 7/10, acide rétinoïque) produits par des fibroblastes et cellules mésenchymateuses thymiques^{59,60}.

Alors que les étapes précises de différenciation des cTECs demeurent mal comprises, les signaux assurant la spécification et la différenciation des mTECs sont beaucoup mieux

caractérisés. La différenciation des mTECs repose principalement sur la superfamille des récepteurs aux TNF (RANK, CD40, LT β R), qui activent les voies canoniques et non-canoniques de NF- κ B (Figure 1.5)⁶¹⁻⁶⁶. En parallèle avec d'autres régulateurs (HDAC3, TGF β), ces voies de signalisation permettent d'établir et de maintenir un programme d'expression génique propre aux mTECs^{67,68}. L'inactivation d'intermédiaires de signalisation des voies canoniques (RELA) et non-canoniques (RELB, NIK, IKK α) de NF- κ B influence non seulement le développement des mTECs, mais également l'organisation de la médulla³⁸. Or, les thymocytes sont la source principale des ligands aux récepteurs TNF (LT, RANKL, CD40L) responsables du développement des mTECs (Figure 1.5)⁶¹⁻⁶⁶. En effet, à partir du jour embryonnaire 11 à 12 chez la souris, des cellules hématopoïétiques et précurseurs lymphoïdes colonisent le thymus et fournissent des signaux instructifs pour le développement des TECs³⁸. Ces interactions lympho-stromales sont de nature bi-directionnelles, car d'une part les TECs contrôlent le développement des thymocytes et de l'autre, les thymocytes produisent des ligands essentiels au maintien des TECs³⁸. Ces interactions lympho-stromales réciproques sont requises très tôt dans le développement et elles permettent d'établir un arrangement tridimensionnel des TECs ainsi que l'organisation des régions corticales et médullaires. De plus, l'expression individuelle ou combinatoire de ligands TNF chez les lignées conventionnelles ou non-conventionnelles de thymocytes est importante pour la transition entre progéniteurs de mTECs (mTEC immatures) et mTEC matures exprimant le régulateur auto-immun AIRE³⁸. Les mTEC matures jouent un rôle déterminant dans l'établissement de la tolérance centrale, un processus grâce auquel les thymocytes auto-réactifs sont éliminés dans le thymus, ce qui prévient l'apparition de réaction de type auto-immunes à l'extérieur du thymus²⁵.

En résumé, les TECs répondent à une multitude de signaux d'origine stromale ou hématopoïétique produits dans leur microenvironnement thymique immédiat. De plus, ces stimuli sont requis très tôt au stade embryonnaire et les interactions lympho-stromales qui en découlent persistent au stade post-natale pour contrôler l'homéostasie et la différenciation des TECs.

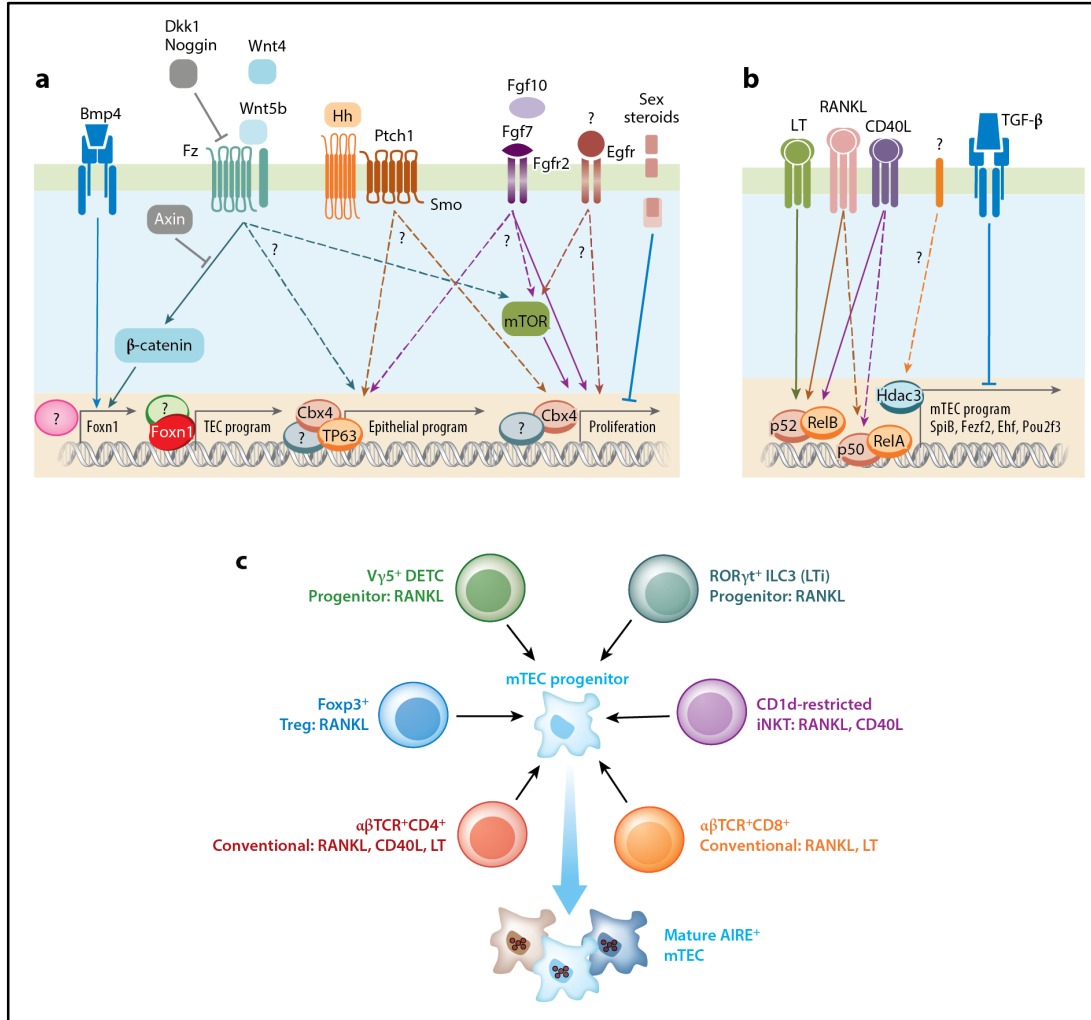


Figure 1.5 | Mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant le développement et la différenciation des TECs. (A) Le développement des TECs est contrôlé par plusieurs stimuli extrinsèques qui activent des voies de signalisation essentielles à la spécification, la différenciation et la prolifération des TECs. (B) La développement des mTECs dépend de signaux perçus par une famille de récepteurs aux TNF (RANK, CD40, LTβR). Ces récepteurs activent la voie canonique et non-canonique de la signalisation NF-κB, ce qui permet d'établir un programme transcriptionnel spécifique aux mTECs. (C) Le développement de la médulla thymique nécessite des signaux provenant d'une variété de cellules hématopoïétiques. Ces interactions bidirectionnelles sont initiées dans le thymus embryonnaire pour établir les premières populations de mTEC matures et elles persistent également dans le thymus post-natal. Reproduit avec la permission de *Annual Reviews* (Abramson et Anderson³⁸).

1.1.5.2 Rôles des cellules épithéliales thymiques corticales

1.1.5.2.1 Développement initial des thymocytes

Pendant leur parcours dans le thymus, les précurseurs de thymocytes doivent traverser une série de points de contrôle extrêmement rigoureux (Figure 1.6). Globalement, c'est plus 95% des thymocytes qui échoueront une de ces étapes critiques⁴¹. Le développement des thymocytes débute par la colonisation du thymus par des précurseurs primitifs de thymocytes qui dérivent des cellules souches hématopoïétiques (Figure 1.6)⁶⁹. L'attraction de ces cellules se produit à la région cortico-médullaire vascularisée et est notamment contrôlée par la production de chimiokines (CXCL12, CCL25) par les cTECs (Figure 1.7)⁴¹. Les précurseurs intra-thymiques de thymocytes sont multipotents, c'est-à-dire qu'il possède un potentiel de différenciation vers plusieurs lignées cellulaires (cellules myéloïdes, cellules B et T)⁷⁰. Or, la spécification des thymocytes vers la lignée des lymphocytes T est caractérisée par une perte graduelle de cette multipotence dans le cortex thymique⁷⁰. Ce stade développemental survient chez les thymocytes CD4⁻CD8⁻ double négatif (DN), qui représentent un ensemble de 4 populations cellulaires (DN1 à DN4) qui peuvent être définies par l'expression des marqueurs de surface CD25 et CD44⁶⁹.

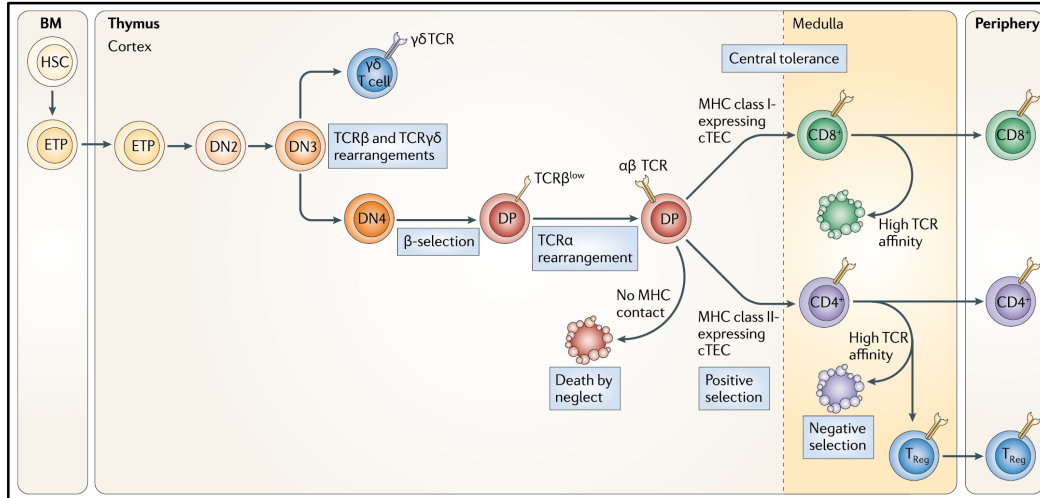


Figure 1.6 | Points de contrôle dans la différenciation des thymocytes. Dans le cortex thymique, les précurseurs primitifs de thymocytes transitent entre le stade $CD4^-CD8^-$ double négatif (DN) et $CD4^+CD8^+$ double positif (DP), réarrangent leurs gènes TCR et traversent des étapes clés qui visent à tester la fonctionnalité de leur TCR. Dans la médulla thymique, les thymocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ simple positif (SP) auto-réactifs sont éliminés via la sélection négative. Selon l'affinité de leur TCR, les thymocytes $CD4^+$ SP peuvent également être déviés vers la lignée des cellules T régulatrices (T_{reg}). BM, moelle osseuse; HSC, cellules souches hématopoïétiques; ETP, précurseurs de thymocytes; TCR, récepteur des cellules T; MHC, complexe majeur d'histocompatibilité. Reproduit avec la permission de *Nature Publishing Group* (Miller⁶⁹).

La spécification des thymocytes vers la lignée des cellules T nécessite une répression constante des programmes d'expression génique des autres lignées cellulaires. La production du ligand de Notch1 (DLL4) par les cTECs est absolument nécessaire pour ce processus (Figure 1.7)⁷⁰. Une fois la signalisation Notch activée au stade DN2, NOTCH1 coopère avec d'autres facteurs de transcription (GATA3, RUNX1, protéines de type *E-box*) afin d'amorcer la différenciation en cellules T⁷⁰. La signalisation Notch induit un programme d'expression génique qui modifie le métabolisme cellulaire et supporte la survie cellulaire des thymocytes³⁸. De plus, les cTECs fournissent également aux thymocytes d'autres molécules (KITL, IL-7) qui favorise leur survie et leur différenciation (Figure 1.7)³⁸. Par la suite, les thymocytes au stade DN3 engagés vers la lignée T enclenchent un réarrangement obligatoire des segments de gènes variables du TCRβ⁶⁹. Pour les thymocytes αβ, le premier point de contrôle consiste à vérifier l'efficacité du réarrangement au niveau du locus codant pour le TCRβ, une étape connue sous le nom de sélection β (Figure 1.6)⁶⁹.

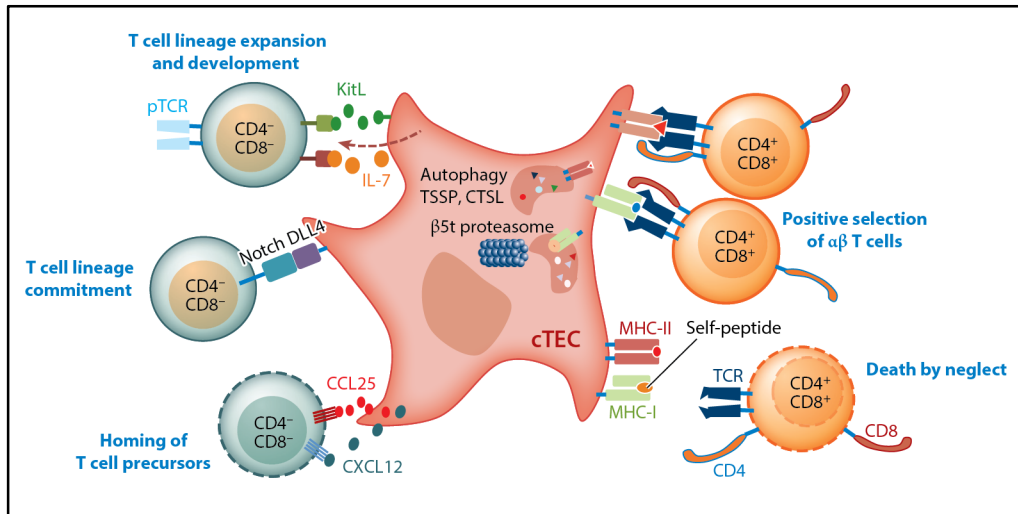


Figure 1.7 | Interactions entre cTECs et thymocytes. Les cTECs expriment et produisent des molécules impliquées dans l'attraction de précurseurs hématopoïétiques, la spécification des thymocytes vers la lignée des cellules T et l'expansion et le développement des thymocytes. Via les complexes peptides-CMH présentés à leur surface, les cTECs participent également à la sélection positive des thymocytes CD4⁺CD8⁺ double positif (DP). Reproduit avec la permission de *Annual Reviews* (Abramson et Anderson³⁸).

1.1.5.2.2 Sélection β des thymocytes $\alpha\beta$ classiques

Bien qu'il existe des thymocytes avec des chaînes TCR $\gamma\delta$ réarrangées pour qui les points de contrôle sont légèrement différents (Figure 1.6), cette section portera uniquement sur le développement des thymocytes $\alpha\beta$ classiques⁶⁹. Lors de la sélection β , les thymocytes doivent tester la fonctionnalité de leur pré-TCR composé de la chaîne TCR β réarrangée au préalable, de chaînes CD3 et d'une chaîne pré-TCR α temporaire qui lie le TCR β en absence de réarrangement au locus du TCR α ⁷¹. Cette étape est entièrement antigène-indépendante et elle dépend de l'hétérodimérisation du pré-TCR, ce qui active des intermédiaires de signalisation du TCR similaires à ceux retrouvés chez les cellules T matures⁷⁰. Les thymocytes qui produisent une signalisation pré-TCR et qui parviennent donc à la sélection β reçoivent alors des signaux de survie et prolifèrent activement³⁸. De plus, en initiant l'expression des corécepteurs CD4 et CD8, ces thymocytes acquièrent un phénotype DP et procèdent par la suite au réarrangement du TCR α (Figure 1.6). Aussi, en modifiant l'expression de récepteurs de surface, ces thymocytes deviennent progressivement insensibles à des signaux produits par le stroma thymique qui influencent les étapes initiales du développement des thymocytes au stade DN⁶⁹. À l'opposé, ces thymocytes deviennent progressivement sensibles à des signaux produits par l'épithélium thymique qui sont impliqués dans des étapes ultérieures de leur maturation.

1.1.5.2.3 Sélection positive

Afin de subsister après la sélection β , les thymocytes DP doivent recevoir une signalisation TCR $\alpha\beta$ via des complexes CMH qui présentent des peptides du soi à la surface des cTECs (Figure 1.7)⁷². Malgré la nature aléatoire des réarrangements TCR et de la diversité des allèles CMH, la sélection positive permet de sélectionner les clones de thymocytes avec un TCR fonctionnel pouvant interagir avec les molécules du CMH⁷³. Cette étape génère donc des thymocytes CD4⁺ et CD8⁺ SP qui sont restreints au CMH I et CMH II, respectivement. À l'opposé, les thymocytes qui expriment un TCR incapable de reconnaître les molécules du soi seront éliminés par apoptose en seulement quelques jours⁷³. En d'autres mots, la sélection positive permet de sélectionner uniquement les thymocytes qui expriment un TCR fonctionnel capable de reconnaître les molécules du soi. Pour assurer la sélection positive, les cTECs utilisent des machineries intracellulaires hautement spécialisées pour la production intracellulaire de peptides antigéniques présentés par le CMH I et le CMH II (Figure 1.7)⁷⁴.

1.1.5.3 Rôles des cellules épithéliales thymiques médullaires

1.1.5.3.1 Sélection négative et développement des T_{reg}

Suite à la sélection positive, le gradient de chimiokine (CCL21) produit par les mTECs assure la migration des thymocytes SP du cortex vers la médulla^{65,75}. Or, le rôle fondamental de la médulla thymique est d'induire la tolérance au soi immunitaire (tolérance centrale) via deux mécanismes : (1) la sélection négative des thymocytes $\alpha\beta$ auto-réactifs et (2) la production intra-thymique de T_{reg} (Figure 1.6)⁷³. Aussi, les mTECs supportent le développement de nombreuses lignées non-conventionnelles de cellules T : des cellules T $\gamma\delta$, des cellules T tueuses naturelles (NK) et des lymphocytes intraépithéliaux qui résident dans l'intestin (Figure 1.8)⁷⁶. Or, les mTECs assurent la maturation de ces lignées non-conventionnelles par un processus de sélection agoniste impliquant des molécules différentes de celles utilisées pour la sélection des thymocytes $\alpha\beta$ ³⁸.

Afin d'établir un répertoire fonctionnellement compétent, les thymocytes exprimant un TCR $\alpha\beta$ avec une affinité trop élevée pour les molécules du soi présentées par les mTECs doivent subir une délétion clonale⁷³. Notamment, cette sélection négative permet d'éliminer les clones auto-réactifs qui causeraient des réactions auto-immunes une fois hors du thymus en réagissant avec des antigènes du soi²⁵. Dans le thymus, les événements de sélection clonale des thymocytes reposent sur le principe du seuil limite d'affinité apparente du TCR⁷⁷. Au niveau de la sélection positive dans le cortex, l'auto-restriction du TCR pour les molécules du soi via une interaction de faible affinité induit la survie cellulaire alors qu'une absence d'interaction mène au destin cellulaire inverse, soit la mort cellulaire par apoptose⁷⁷. Or, la sélection négative opère différemment. En effet, les thymocytes avec un TCR de trop forte affinité pour les antigènes du soi meurent par apoptose alors que ceux qui tolèrent le soi en raison d'un TCR avec une affinité très faible survivent (Figure 1.6)⁷³. L'induction de la tolérance vis-vis certains antigènes repose également sur la production intra-thymique de T_{reg}⁷⁸, des cellules avec des propriétés immunosuppressives leur permettant de moduler l'homéostasie et les fonctions effectrices des lymphocytes T en périphérie⁷⁹. Or, le processus de sélection intra-thymique des T_{reg} constitue une zone grise. En effet, les T_{reg} semblent exprimer un TCR d'affinité

intermédiaire et leur sélection requiert plusieurs signaux de co-stimulation qui sont encore mal définis^{80,81}.

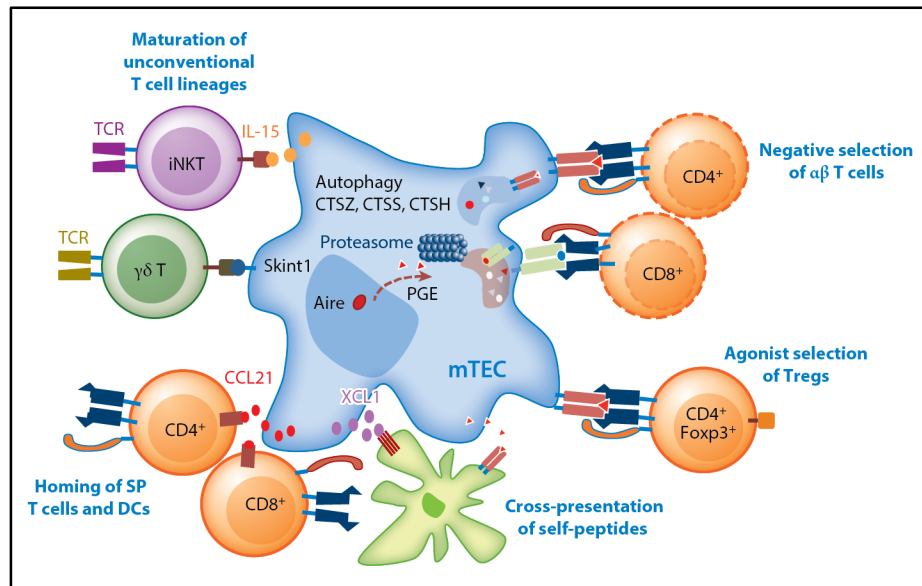


Figure 1.8 | Interactions entre mTECs et thymocytes. Les mTECs jouent un rôle critique en orchestrant plusieurs processus aux stades ultérieurs du développement des thymocytes. Premièrement, les mTECs sont une source de chimiokines telles que CCL21 et XCL1, qui assurent la migration des thymocytes CD4⁺ et CD8⁺ simple positif (SP) sélectionnés positivement et des DCs dans la médulla, respectivement. De plus, puisque les mTECs expriment la quasi-totalité des gènes codant pour des protéines, ces cellules représentent un réservoir d'antigènes ubiquitaires et tissu-spécifiques qu'elles présentent aux thymocytes SP via les molécules du CMH I et du CMH II. Des interactions de haute affinité entre les complexes peptides du soi-CMH et les TCR respectifs présents à la surface des thymocytes mène à l'élimination de ces clones auto-réactifs. Des interactions d'affinité intermédiaire entre les complexes peptides du soi-CMH et les TCR respectifs présents à la surface des thymocytes CD4⁺ SP mène à la sélection agoniste de T_{reg}. L'efficacité de la présentation antigénique est augmentée via la présentation croisée d'antigènes qui résulte d'un transfert entre mTECs et DCs. Finalement, les mTECs jouent un rôle important dans la maturation de différentes lignées non-conventionnelles de lymphocytes T. Reproduit avec la permission de *Annual Reviews* (Abramson et Anderson³⁸).

Une question fondamentale subsiste : comment font les mTECs pour présenter le plus fidèlement possible l'ensemble des antigènes présents dans l'organisme ? D'une part, tel qu'il sera décrit à la section suivante, les mTECs possèdent une capacité unique pour produire des antigènes du soi, de courts peptides issus de la dégradation de protéines normales de l'organisme dont le patron d'expression est restreint à certains tissus et organes²⁵. La présentation de ces antigènes tissu-spécifiques à la surface des mTECs permet donc aux thymocytes en développement de voir le soi immunologique véritable afin de tester l'affinité de leur TCR. De plus, les mTECs sont elles-mêmes des cellules présentatrices d'antigènes efficaces et elles ont la capacité de transférer le contenu de leur réservoir d'antigènes à des DCs qu'elles mobilisent dans leur microenvironnement immédiat³⁸. Ensemble, les mTECs et les DCs de la médulla thymique participent à la sélection négative des thymocytes auto-réactifs et sont donc essentiels pour l'établissement de la tolérance au soi.

À l'instar des cTECs qui utilisent une machinerie protéolytique spécialisée pour la production de peptides antigéniques utilisés pour la sélection positive, les mTECs sont également dotées d'une machinerie qui leur est propre (Figure 1.8). Entre autres, les mTECs font de l'autophagie afin de présenter via les molécules du CMH II, des antigènes dérivant de composantes intracellulaires⁷³. Les mTECs expriment également plusieurs cathepsines, des enzymes lysosomiales qui produisent des peptides pour la présentation antigénique du CMH II⁷³. En ce qui attrait à la présentation antigénique via les molécules du CMH I, les mTECs utilisent évidemment le protéasome constitutif (CP) pour la production de peptides mais ces cellules expriment aussi l'immunoprotéasome (IP)^{72,82}. L'IP est une forme alternative du CP qui possède des préférences de clivage différentes du CP en raison de la nature de ses sous-unités catalytiques⁸³. L'IP est principalement exprimé dans des populations de cellules immunitaire (lymphocytes, DCs, macrophage) et il possède une capacité plus élevée que le CP pour générer des peptides antigéniques présentés par le CMH I⁸⁴. Or, bien que les mTECs représentent le seul exemple de cellules épithéliales qui expriment l'IP, il demeure inconnu si l'IP dans les mTECs sert uniquement à la production de peptides antigéniques pour la sélection négative^{85,86}.

1.1.5.3.2 Expression génique promiscuitaire

D'un point de vue phénotypique et fonctionnel, les mTECs font parties d'une population cellulaire hétérogène⁴⁶. Alors que les mTEC immatures sont essentiellement un répertoire de cellules permettant de générer des mTEC matures, ces dernières jouent un rôle de premier plan dans l'établissement de la tolérance au soi⁸⁷. Afin d'exprimer un maximum d'antigènes du soi, les mTEC matures font de l'expression génique promiscuitaire (EGP), un mécanisme de régulation atypique de l'expression génique⁸⁸. En exprimant de manière spécifique des régulateurs transcriptionnels qui permettent de moduler l'expression génique à large échelle, les mTEC matures possèdent la capacité unique d'exprimer la quasi-totalité des gènes codant pour des protéines⁷³. Au total, c'est environ 18,000 gènes qui sont exprimés chez les mTEC matures, ce qui représente 80% du génome codant pour des protéines⁸⁹. Or, la plupart des populations cellulaires expriment ~13,000 gènes, ce qui représente seulement 60% du génome codant pour des protéines⁹⁰. C'est donc dire qu'en plus de leur programme d'expression génique spécifique et des gènes ubiquitaires, les mTEC matures expriment plusieurs transcrits illégitimes (environ 5,000) qui sont normalement retrouvés chez des populations cellulaires différenciées présentes dans des tissus autres que le thymus⁹¹. Or, ces gènes exprimés de façon ectopique par les mTEC matures mais avec un patron d'expression tissu-spécifique sont la source principale d'antigène du soi pour l'établissement de la tolérance centrale⁹². L'expression individuelle des antigènes du soi est capitale, car la perte d'expression d'un seul antigène du soi chez les mTECs est suffisante pour induire une réponse auto-immune contre ce même antigène en périphérie⁹¹.

Bien que l'EGP facilite grandement la représentation du soi immunitaire dans le thymus, certains gènes ne sont pas exprimés par les mTEC matures⁹³. En effet, alors que la plupart des tissus sont représentés dans les mTECs, plusieurs gènes exprimés dans des sites immunoprivilégiés (e.g. cerveau, testicules) sont sous-représentés³⁸. C'est donc dire qu'une tolérance centrale plus permissive existe pour les tissus où la surveillance immunologique est plus restreinte. De plus, certains lymphocytes T reconnaissant des antigènes du soi peuvent être détecté en périphérie, ce qui implique que des mécanismes de tolérance périphériques doivent continuellement les surveiller³⁸.

L'EGP n'opère pas selon les règles standard de l'expression génique⁹⁴. De plus, ce mode de régulation de l'expression génique repose sur des régulateurs transcriptionnels complètement différents de ceux utilisés en périphérie pour l'expression d'un gène donné³⁸. Au niveau de la population de mTEC matures, c'est seulement 1 à 3% des mTECs qui expriment un antigène du soi à un temps donné^{89,95}. Cette expression mosaïque n'est pas totalement stochastique, car chez les mTEC matures individuelles, les antigènes du soi sont exprimés en groupes de co-expression d'environ 100 à 300 gènes⁹⁶⁻⁹⁸. C'est donc dire qu'afin de voir le portrait global du soi immunitaire, les thymocytes de la médulla thymique doivent interagir avec quelques centaines de mTEC matures³⁸.

Ce n'est qu'en 2001 que des chercheurs ont identifié le premier régulateur de l'EGP. Dans cette étude charnière, ils ont démontré que le régulateur auto-immun (AIRE) contrôle une large fraction de l'EGP⁹⁹. Puisque l'expression de la protéine AIRE est elle-même restreinte aux mTEC matures¹⁰⁰, cette découverte expliquait bien pourquoi l'étendue d'EGP est maximale chez les mTEC matures⁸⁹. L'importance de ce régulateur transcriptionnel dans la tolérance au soi peut être illustré par le fait que des patients avec des mutations dans le gène *AIRE* développent un grave syndrome auto-immun affectant plusieurs organes¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Cette pathophysiologie est également retrouvée chez les souris qui n'expriment pas le gène *Aire*⁹⁹. Cela peut être expliqué par le fait qu'en absence de la protéine AIRE, de nombreux antigènes du soi ne sont pas exprimés par les mTEC matures. Ainsi, sans subir de délétion clonale, des thymocytes auto-réactifs pour ces antigènes du soi peuvent quitter le thymus et causer de l'auto-immunité en périphérie¹⁰⁵.

AIRE est un facteur de transcription non-conventionnel, car il ne possède pas de sites consensus de liaison à l'ADN¹⁰³. Afin d'induire l'expression de nombreux transcrits ectopiques illégitimes dont l'expression est restreinte à des tissus extra-thymiques, AIRE agit principalement au niveau épigénétique et au niveau de l'initiation de la transcription³⁸. Bien que AIRE ait une empreinte transcriptionnelle très vaste, ce régulateur transcriptionnel a un haut degré de spécificité pour les régions du génome associées à une faible transcription des gènes. Notamment, AIRE est recruté aux loci qui présentent des marques épigénétiques associées à la répression transcriptionnelle. Par exemple, AIRE reconnaît des modifications locales des histones telles que l'histone 3 non-méthylée en

position lysine 4 (H3K4me0) et plusieurs autres marques répressives à la transcription (H3K27me3, H3K9me3)^{89,106–109}. L'accessibilité à certaines régions chromosomiques est aussi contrôlée par la méthylation des dinucléotides CpG. Or, AIRE reconnaît certains patrons de méthylation de l'ADN dans les régions promotrices de la transcription via une interaction avec le complexe ATF7ip/MBD1 qui reconnaît les régions CpG hyperméthylées¹¹⁰. Une fois recruté à ces régions faiblement transcrites, AIRE induit des changements locaux dans la structure de la chromatine pour la rendre plus permissive à la transcription¹¹¹. De plus, AIRE recrute une variété de régulateurs transcriptionnels qui permettent d'initier la transcription à ces loci autrement réprimés et qui assurent la maturation des ARN messager produits^{112–119}. Depuis 2015, AIRE n'est plus le seul régulateur reconnu pour contrôler l'EGP. En effet, via son site consensus de liaison à l'ADN, le facteur de transcription FEZF2 contrôle l'expression de nombreux gènes ectopiques chez les mTEC matures¹²⁰. Toutefois, bien que FEZF2 induise l'expression de plusieurs gènes de manière AIRE-indépendante chez les mTEC matures, son implication dans l'établissement de la tolérance au soi reste à être évaluée.

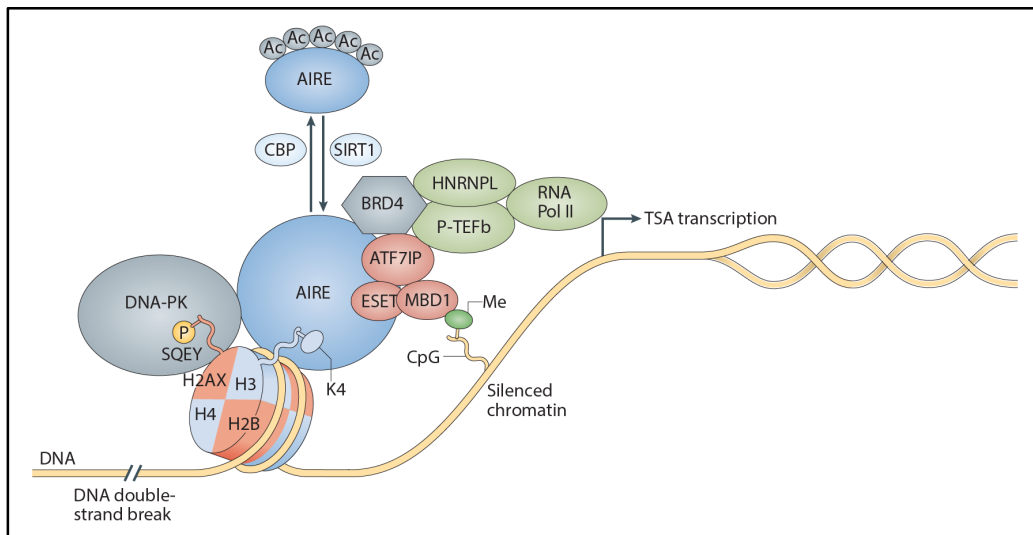


Figure 1.9 | Contrôle de l'EGP par le régulateur auto-immun AIRE. AIRE est recruté aux régions de la chromatine associées à une répression transcriptionnelle. AIRE interagit avec plusieurs protéines qui modifie la structure de la chromatine afin de la rendre permissive et accessible pour d'autres régulateurs transcriptionnels. Reproduit avec la permission de *Nature Publishing Group* (Anderson et Su¹²¹).

1.2 Involution thymique

L'immunité adaptative diminue considérablement avec l'âge et l'attrition précoce du thymus contribue grandement à cet état d'immunodéficience¹²². Tel que décrit précédemment, les TECs forment des microenvironnements essentiels à la fonction du thymus. Or, l'homéostasie de l'épithélium thymique est hautement dynamique, notamment parce que les TECs doivent constamment faire face à plusieurs types de stress physiologiques aigus et chroniques³⁸. Ces dommages au niveau cellulaire peuvent être divisés en deux catégories : (1) les dommages âge-dépendants ou associés au vieillissement et (2) les dommages âge-indépendants. La plasticité de l'épithélium thymique est davantage évidente chez les individus âgés, chez qui l'architecture générale du thymus est hautement altérée¹²³. Par exemple, les régions thymiques corticales et médullaires deviennent progressivement irrégulières et atrophiées avec l'âge¹²⁴. De plus, l'espace occupé entre ces deux régions (l'espace cortico-médullaire) devient graduellement désorganisé et perd de sa définition¹²⁵. Finalement, la diminution de l'espace occupé par l'épithélium thymique est accompagnée d'un élargissement de l'espace péri-vasculaire et d'une augmentation du volume de tissus adipeux^{124,126}.

Même si le vieillissement prématuré du thymus représente l'immunopathologie la plus fréquente chez l'humain, cette attrition est encore considérée aujourd'hui comme un phénomène énigmatique. Malgré l'identification de plusieurs facteurs contribuant de façon partiel et transitoire au vieillissement du thymus, il n'existe aucune explication satisfaisante permettant de comprendre les mécanismes précis responsables de la dégénérescence thymique. Or, tel qu'il sera présenté dans les chapitres 2 et 3, nos travaux de recherche supportent un nouveau paradigme et fournissent un pouvoir explicatif appréciable en ce qui a trait aux mécanismes cellulaires et moléculaires du vieillissement thymique.

1.2.1 Involution thymique âge-dépendante

Une propriété distinctive du thymus est qu'il croît rapidement à partir du stade embryonnaire précoce jusqu'à la période périnatale et qu'il s'atrophie graduellement par la suite chez les individus adultes¹²⁷. La diminution progressive de la taille et de la fonction du thymus avec l'âge, aussi appelé involution thymique, est une propriété conservée dans l'évolution du système immunitaire adaptatif qui a été observé chez les mammifères, les poissons et les oiseaux¹²⁸. Chez l'homme, environ 75% de l'épithélium thymique est remplacé par du tissu fibro-adipeux avant l'âge de 45 ans¹²⁹⁻¹³². Historiquement, avoir un thymus très peu fonctionnel à 45 ans alors que l'espérance de vie était d'environ 40-50 ans ne posait pas de problèmes. Cependant, avec l'augmentation de l'espérance de vie (>80 ans) suite à l'arrivée de la médecine moderne, la fonction du thymus ne semble pas avoir suivie. Chez la souris, le thymus atteint sa taille maximale vers l'âge de 4 semaines, puis subi une atrophie importante, caractérisée par une perte progressive des TECs¹²⁷.

Le vieillissement du thymus précède celui de la plupart des organes et altère l'activité thymopoïétique, c'est-à-dire la capacité du thymus et plus particulièrement des TECs à assurer le développement des thymocytes⁴². D'une part, la quantité de thymocytes produits chez des individus âgés est grandement diminué, ce qui mène à plusieurs effets délétères au niveau de la fonction du système immunitaire adaptatif. Notamment, en diminuant la production de lymphocytes T dans le thymus, la diversité du répertoire de lymphocytes T naïfs en périphérie est considérablement affectée¹³³. Ce phénomène favorise l'expansion homéostatique des lymphocytes T en périphérie, ce qui induit un biais supportant la production de lymphocytes T mémoires^{134,135}. La conséquence directe de ce phénomène est une immunité adaptative altérée en réponse aux antigènes n'ayant jamais été vu par le système immunitaire, qui inclut les nouveaux pathogènes, les vaccins et les antigènes spécifiques aux tumeurs^{124,136,137}. L'involution thymique contribue donc directement à l'augmentation de la susceptibilité aux infections, mène à une réponse immunitaire inadéquate à la vaccination et augmente l'incidence des cancers^{138,139}. Aussi, puisque les cellules qui permettent d'établir la tolérance au soi (i.e. les mTECs) sont perdues avec l'âge, les chances que des lymphocytes T auto-réactifs puissent être relâchés vers la périphérie sont donc augmentées^{140,141}. L'involution thymique est donc en partie

responsable de l'augmentation avec l'âge de la susceptibilité aux maladies auto-immunes, qui affectent environ 5% de la population générale¹⁴². L'involution thymique représente donc un facteur de risque important pour la pathogenèse de maladies graves et c'est notamment pourquoi le rajeunissement du thymus est perçu comme une stratégie thérapeutique attirante pour améliorer la santé générale des populations.

Au niveau qualitatif, les thymocytes produits dans un microenvironnement thymique atrophié ne sont pas aussi fonctionnels que ceux d'un individu en plus bas âge. En outre, ces thymocytes ont un phénotype associé à l'épuisement cellulaire (e. g., perte de co-stimulation CD28, surexpression de CD57) et expriment des niveaux plus faibles de récepteurs (CD62L, CCR7) leur permettant d'être mobilisé efficacement pour induire une réponse immunitaire adaptative^{143,144}. De plus, ces thymocytes montrent une sénescence répliquative caractérisée par le raccourcissement des télomères, s'arrêtent fréquemment dans le cycle cellulaire, sont réfractaire à l'apoptose et ont une prolifération cellulaire limitée en réponse à une stimulation antigénique^{145,146}.

Malgré le fait que le thymus conserve une certaine activité même chez les individus très âgés¹⁴⁷, cette fonction résiduelle n'est clairement pas suffisante et elle peut être fortement compromise par différents types d'insultes au niveau cellulaire et tissulaire. Dans les prochaines sections, nous traiterons donc des facteurs actuellement associés à l'involution thymique et décrirons également les types de dommages (stress) auxquels peuvent être exposés les cellules de l'épithélium thymique.

1.2.1.1 Facteurs extrinsèques au thymus

1.2.1.1.1 Les hormones

Initialement, les recherches sur l'involution thymique se sont particulièrement focalisées sur l'identification de facteurs extrinsèques au thymus présents dans la circulation systémique. Évidemment, puisqu'elles peuvent induire une vaste gamme de réponses physiologiques à des sites distants de l'organisme, les hormones ont été rapidement perçues comme une cause potentielle à l'involution thymique. L'action des hormones est d'autant plus pertinente, car leur production peut grandement fluctuer avec l'âge¹⁴⁸. Ainsi, il semblait donc logique de proposer que les hormones puissent induire l'involution thymique via deux mécanismes. D'une part, une baisse avec l'âge des niveaux d'hormones stimulant la thymopoïèse ou au contraire, une exposition prolongée à des hormones ayant des effets antagonistes à la thymopoïèse.

Avant même de connaître le rôle précis du thymus, il a été montré que le cortisol, une hormone stéroïdienne de type glucocorticoïde dont les niveaux peuvent fluctuer avec l'âge¹⁴⁹, avait un effet négatif sur la taille du thymus¹⁵⁰. En effet, le cortisol induit l'apoptose massive des thymocytes, ce qui mène à une atrophie aiguë du thymus¹⁵¹. Toutefois, l'effet des hormones stéroïdiennes sexuelles sur le thymus a été beaucoup plus étudié. Bien qu'il soit désormais reconnu que l'involution thymique est indépendante de la puberté¹⁵², deux observations principales peuvent expliquer l'intérêt d'étudier les hormones sexuelles. Premièrement, l'involution thymique devient particulièrement accélérée suite à l'adolescence, une période durant laquelle la production d'hormones sexuelles est maximale. Deuxièmement, une involution thymique transitoire peut être observée pendant la grossesse, qui est caractérisée par une augmentation drastique des niveaux de progestérone¹⁵³. Malgré le fait que les hormones sexuelles puissent induire l'apoptose des thymocytes, plusieurs études ont démontré qu'elles affectent la prolifération et la fonction des TECs, qui expriment le récepteur aux androgènes^{127,154–156}. En effet, les TECs avec une inactivation du récepteur aux androgènes sont partiellement résistantes à l'involution thymique^{157,158} et l'ablation des hormones sexuelles mâles par la castration induit une régénération thymique de courte durée^{159,160}. Ces observations permettent

notamment d'expliquer en partie pourquoi les taux d'involution thymique sont plus élevés chez les mâles que les femelles¹³⁸. De façon analogue, la progestérone est également reconnue pour affecter le stroma thymique et son effet est notamment observable lors de la grossesse, une période durant laquelle une involution thymique majeure mais temporaire survient¹⁵³. Lorsqu'administré de façon systémique, les estrogènes peuvent également réduire la cellularité du thymus de façon considérable. Dans le thymus, l'action des estrogènes mène principalement à une déplétion de la population la plus primitive de progéniteurs de thymocytes et inhibe la prolifération des thymocytes^{161,162}. Cependant, l'action des hormones sexuelles sur le stroma thymique n'offre pas suffisamment de pouvoir explicatif, car le thymus continue de s'atrophier avec l'âge et ce, même si les niveaux d'hormones sexuelles diminuent drastiquement. À l'opposé des hormones stéroïdiennes, l'hormone de croissance (GH), une hormone polypeptidique de l'hypophyse antérieure dont la concentration circulante diminue avec l'âge¹⁴⁸, peut augmenter la taille du thymus. En effet, l'administration exogène de GH augmente la cellularité du thymus dans plusieurs modèles expérimentaux de souris immunocompromises et âgées¹⁶³⁻¹⁶⁵. Comme le récepteur à l'GH est exprimé à la fois sur les thymocytes et les TECs, la cible cellulaire des effets de cette hormone demeure inconnue¹⁶⁶. Toutefois, les premières manifestations de l'involution thymique surviennent plus hâtivement et ne corrèlent pas parfaitement avec la période durant laquelle les niveaux d'GH commencent à diminuer.

La ghréline est une hormone polypeptidique gastrique qui stimule l'appétit, contrôle l'adipogenèse et influence la sécrétion de l'GH. Plusieurs études ont démontré que les réseaux de signalisation impliquant la ghréline ont un effet positif sur la thymopoïèse¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Cependant, l'expression de la ghréline et de son récepteur diminue avec l'âge dans le microenvironnement thymique¹⁶⁸ et une perte de signalisation ghréline-dépendante accélère l'adipogenèse thymique avec l'âge¹⁶⁷. Or, les adipocytes produisent la leptine (adipokine), une hormone de satiété qui se lie à ses récepteurs dans l'hypothalamus, une région du cerveau qui contrôle la communication neuroendocrine entre le système nerveux central et les tissus périphériques. Une insuffisance en leptine ou de son récepteur mène à l'obésité autant chez la souris que chez l'humain¹⁷⁰⁻¹⁷². Chez ces individus obèses, la fonction thymique est grandement diminuée et des réponses inflammatoires augmentées sont observées¹⁷¹. Or, il a été démontré que l'effet de la leptine sur la fonction thymique

est en partie attribuable à la suppression de l'obésité et non due à son effet sur les cellules constituant le thymus¹⁷¹. Les travaux portant sur la ghréline et la leptine suggèrent que le remplacement du stroma thymique par du tissu adipeux pourrait induire l'atrophie thymique et une diminution de la production de lymphocytes T. Ils proposent également que des médiateurs pro-inflammatoires produits par le tissu adipeux puissent être cytotoxique pour le stroma thymique. En effet, une augmentation de l'adipogenèse est observée dans plusieurs tissus et organes avec l'âge¹⁷³. Ainsi, bien que l'atrophie thymique corrèle avec une augmentation de l'adipogenèse, il demeure inconnu pourquoi le microenvironnement thymique est davantage affecté par le tissu adipeux que d'autres organes.

1.2.1.1.2 Les progéniteurs hématopoïétiques

Il a également été proposé que des défauts dans les progéniteurs de thymocytes provenant de la moelle osseuse pourraient contribuer à l'involution thymique^{143,174}. Cette hypothèse a pu être testée grâce à plusieurs approches expérimentales qui permettent d'étudier le développement de progéniteurs hématopoïétiques provenant de donneurs jeunes ou âgés dans un microenvironnement thymique provenant de souris jeunes. Ces approches ont notamment permis de mettre en évidence que les cellules de moelle osseuse provenant de donneurs âgés sont moins efficaces pour repeupler le thymus de souris receveuses jeunes irradiées¹⁷⁵ et qu'elles ont un potentiel de différenciation diminué pour différentes lignées de lymphocytes T¹⁷⁶. Cependant, l'expérience inverse a mené à des résultats non-anticipés. En effet, la repopulation du thymus est plus faible chez des souris receveuses âgées transplantées avec des cellules de moelle osseuse provenant de souris plus jeunes, ce qui indique que la repopulation du thymus ne dépend pas entièrement de l'âge des progéniteurs hématopoïétiques^{177,178}. Aussi, en transplantant un thymus fœtal (source de stroma thymique très jeune) sous la capsule rénale de souris receveuse jeunes ou vieilles (progéniteurs hématopoïétiques plus ou moins jeunes), il a été montré que la cellularité et la croissance du thymus greffés chez les souris jeunes et âgées était similaire¹⁷⁹. Ainsi, même si des changements âge-dépendants chez les progéniteurs hématopoïétiques peuvent avoir une implication mineure dans l'involution thymique, ces résultats suggèrent que la cellularité du thymus est contrôlé par le microenvironnement thymique lui-même¹⁸⁰. Finalement, une expérience élégante de type parabiose a été réalisée pour formellement évaluer l'impact des facteurs circulants et des progéniteurs hématopoïétiques sur la fonction endogène du thymus¹⁸¹. Cette expérience consistait à établir une fusion chirurgicale du système sanguin de deux souris (jeune/vieille, jeune/jeune ou vieille/vieille) en vue d'étudier leur influence réciproque sur le thymus. Grâce à cette approche, il a été démontré que le système circulatoire d'une souris jeune à lui seul est incapable de régénérer le thymus d'une souris âgé. À l'inverse, le système circulatoire d'une souris âgée est insuffisant pour induire l'atrophie d'un jeune thymus¹⁸¹. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent donc que les facteurs étiologiques responsables de l'involution thymique ne sont pas circulants, mais intrinsèque au thymus.

1.2.1.2 Facteurs intrinsèques au thymus

Deux types principaux de facteurs contribuent à l'involution thymique de manière intrinsèque : (1) les facteurs influençant le développement des thymocytes (immigration, prolifération, différenciation, émigration) et (2) les facteurs affectants l'homéostasie du stroma thymique. Ces facteurs ne sont pas mutuellement exclusifs, car les thymocytes et les cellules stromales thymiques sont engagés dans une pléthore d'interactions bidirectionnelles essentielles à leur homéostasie. Toutefois, puisque les TECs sont les véritables maître d'orchestre de l'activité thymopoïétique, cette section traitera principalement des facteurs affectant l'homéostasie des TECs.

Malgré le fait que le nombre de thymocytes dépasse le nombre de TECs par plusieurs ordres de grandeur, de nombreuses études ont démontré l'existence d'une corrélation positive robuste entre le nombre de TECs fonctionnelles et la taille du thymus^{182,183}. Par exemple, cette corrélation peut être observée chez des souris mutantes pour les gènes de la famille *rétinoblastome*, des gènes suppresseurs de tumeur qui exercent un contrôle négatif sur la progression du cycle cellulaire. L'inactivation du gène *rétinoblastome* chez la jeune souris mène à l'expansion de TECs et prévient l'involution thymique¹⁸⁴. Aussi, des souris transgéniques avec une sur-expression de cycline D1 (régulateur positif du cycle cellulaire) dirigée dans les tissus épithéliaux montrent également une hyperplasie thymique significative¹⁸⁵. Donc, malgré leur nombre restreint dans le thymus, l'expansion des TECs via la prolifération cellulaire est suffisante pour augmenter la taille du thymus. Une question demeure, pourquoi est-ce que le nombre de TECs diminue drastiquement avec l'âge? Afin d'élucider les mécanismes responsables de ce phénomène, les recherches ont convergé vers l'étude de caractéristiques typiques associées au vieillissement cellulaire. Tel que décrit par Carlos López-Otín et collaborateurs, neuf dénominateurs communs principaux peuvent être associés au vieillissement¹⁸⁶. Alors que certains de ces dénominateurs ont été amplement analysés dans le contexte de l'involution thymique, d'autres mériteraient de recevoir davantage d'attention.

1.2.1.2.1 Sénescence cellulaire

La perte des TECs avec l'âge est surprenante, car ces cellules ne sont pas sénescentes, c'est-à-dire qu'elles conservent leur capacité d'entrer en division cellulaire. En effet, la plupart des TECs répondent à des signaux mitogéniques en condition physiologique et certaines d'entre elles prolifèrent en réponse à différents types de stress thymique aigu^{187,188}. Notamment, après une ablation de courte durée chez de jeunes souris, une fraction des TECs prolifère activement, ce qui permet de restaurer l'épithélium thymique^{154,189}. Cette observation soulève une question fondamentale: pourquoi est-ce que le potentiel prolifératif des TECs est insuffisant pour prévenir l'involution thymique? Chez des souris âgées de 4 semaines (avant l'initiation de l'involution thymique), environ 10% des TECs prolifèrent alors que moins de 1% des TECs prolifèrent chez des souris âgées d'un an¹²⁷. De plus, comparativement à d'autres cellules épithéliales, un des handicaps majeurs des TECs est qu'elles expriment des niveaux relativement faibles de gènes liés à la régulation positive du cycle cellulaire (cyclines, kinases cycline-dépendantes, facteurs de transcription E2F)¹⁹⁰. Aussi, l'expression de plusieurs de ces gènes diminue avec l'âge¹⁹¹. Donc, le potentiel prolifératif des TECs est sans doute suffisant chez des souris adolescentes ou jeunes adultes pour modérer l'involution thymique mais devient progressivement compromis avec l'âge.

1.2.1.2.2 Épuisement des cellules souches

L'épuisement des cellules souches de TECs est aussi un aspect étroitement étudié dans le contexte de l'involution thymique. Dans le thymus postnatal, les TECs s'auto-renouvellent de manière continue, un processus qui implique un remplacement homéostatique continu des TECs via l'activité de plusieurs populations hétérogènes de cellules souches épithéliales³⁸. Or, plusieurs évidences suggèrent que la réserve de cellules souches permettant de maintenir l'épithélium thymique devient insuffisante avec l'âge. En effet, bien que les mécanismes sous-jacents n'aient pas encore été élucidés, ce phénomène pourrait être attribuable à une perte des cellules souches ou à la diminution de leur capacité d'auto-renouvellement^{181,192,193}. Il est à noter que le comportement des cellules souches peut varier énormément avec l'âge. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques prolifèrent activement pendant les trois premières semaines de vie chez la souris puis elles entrent dans une période de dormance appelée quiescence, pendant laquelle elles se divisent très rarement¹⁹⁴. Ainsi, une des interprétations actuelles à l'involution thymique propose que l'épuisement des cellules souches de TECs est une conséquence de leur prolifération marquée dans la phase périnatale du développement thymique¹⁸⁷. En plus d'être moins nombreuses avec l'âge, le potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches de TECs est plus faible que celui de d'autres populations de cellules épithéliales (épiderme, intestin)^{160,195}. Aussi, l'activité clonogénique des TECs, c'est-à-dire leur capacité à former des colonies de cellules filles in vitro, diminue avec l'âge mais est augmentée en absence de thymocytes^{192,193}. C'est donc dire que la thymopoïèse a un effet négatif sur l'activité des cellules souches de TECs. Il est donc formellement possible que la prolifération et l'apoptose massive des thymocytes représente un stress important pour les TECs^{196,197}. Notamment, l'apoptose des thymocytes relâche dans le microenvironnement thymique des espèces réactives de l'oxygène (ROS)¹⁹⁸ et du TGFβ¹⁹⁹, qui est reconnu pour limiter la prolifération et la maturation des TECs⁶⁸. L'influence de la thymopoïèse sur l'homéostasie des cellules souches de TECs est d'autant plus intéressante considérant que le thymus est probablement l'organe avec l'index apoptotique le plus élevé (>95% des thymocytes sont apoptotiques).

1.2.1.2.3 Altérations génétiques et épigénétiques

Les recherches portant sur l'instabilité génomique, l'attrition des télomères et les réponses physiologiques des TECs aux dommages à l'ADN sont quasi-inexistantes²⁰⁰. Or, l'instabilité génomique mène généralement au ralentissement de la progression ou à l'arrêt complet du cycle cellulaire²⁰¹. Bien que la biologie des TECs puisse changer drastiquement lorsque ces cellules sont étudiées hors de leur microenvironnement physiologique, il a été démontré que les lignées cellulaires de mTECs résistent davantage aux radiations ionisantes que les cTECs²⁰⁰. Toutefois, les fondements moléculaires derrière cette différence de radiorésistance demeurent un mystère. Un mécanisme potentiel serait la régulation sélective de l'homéostasie des mTECs par p53, un médiateur central de l'intégrité et de la stabilité génomique²⁰². De plus, les cTECs sont particulièrement sensibles aux ROS, des agents endogènes pouvant induire de graves lésions à l'ADN. Les cTECs expriment de très faible niveau de catalase et sont donc pratiquement déficientes pour cette enzyme aux fonctions anti-oxydantes²⁰³. Or, comparativement aux cellules lymphoïdes, les TECs accumulent des niveaux augmentés de dommages oxydatifs de l'ADN. Curieusement, la reconstitution de l'expression de la catalase ou alternativement l'administration d'agents antioxydants améliore, mais ne prévient pas l'atrophie thymique²⁰³. Ces résultats suggèrent donc que les dommages métaboliques induit dans les cTECs par la déficience en catalase et donc par l'augmentation du stress oxydatif jouent un rôle important dans la maintenance des cTECs avec l'âge. Ces observations sont d'autant plus importantes considérant que chez l'adulte, la majorité des cellules souches de TECs bipotentes ont un phénotype analogue aux cTECs^{204,205}. Or, afin de maintenir leur fonction, les cellules souches doivent à tout prix éviter d'accumuler des dommages liés au stress oxydatif et des lésions à l'ADN²⁰⁶.

Le vieillissement cellulaire est également associé à des changements majeurs au niveau épigénétique¹⁸⁶. Notamment, la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les microARNs affectent la structure et l'accessibilité de la chromatine, ce qui permet de contrôler le programme d'expression génique avec l'âge²⁰⁷⁻²⁰⁹. Toutefois, les changements épigénétiques associés à l'involution thymique ont été étudiés presque exclusivement dans le contexte du gène *Foxn1*, un gène essentiel pour la

différentiation et la fonction des TECs. En effet, le facteur de transcription FOXN1 contrôle l'expression de gènes clés pour l'activité thymopoïétique des TECs (*Ccl25*, *Cxcl12*, *Dll4*, *Psmbl1*)^{32,48}. De plus, la surexpression du gène *Foxn1* dans le thymus atrophié de vieille souris est suffisante pour renverser presque complètement l'involution thymique²¹⁰. Cependant, l'expression du gène *Foxn1* dans les TECs diminue avec l'âge et deux mécanismes épigénétiques sont associés à ce phénomène. Premièrement, plusieurs microARNs (*miR-205*, *miR-18b*, *miR-518b*, *miR-22*, *miR125a-5p*) sont reconnus pour avoir un effet répressif sur l'expression du gène *Foxn1*²¹¹⁻²¹⁵. Aussi, l'hyperméthylation graduelle du gène *Foxn1* est un autre mécanisme proposé menant graduellement à une diminution de l'activité thymopoïétique des TECs avec l'âge²¹⁶. Toutefois, il demeure inconnu si d'autres gènes essentiels au maintien et à la fonction des TECs deviennent contrôlé de façon aussi étroite au niveau épigénétique avec l'âge. Un gène candidat potentiel serait le gène *p63*, qui est reconnu pour être sujet à une régulation épigénétique dans les cellules épithéliales de la peau^{217,218} et qui est impliqué dans la maintenance des cellules souches de TECs⁵⁶.

1.2.1.2.4 Altérations dans la communication intercellulaire

Au niveau du microenvironnement thymique, les types de signaux impliqués dans la communication intercellulaire impliquant les TECs peuvent varier avec l'âge. En effet, l'involution thymique est associée à une baisse drastique de la production de nombreuses molécules favorisant l'expansion et la régénération des TECs. Avec l'âge, les cellules mésenchymateuses du thymus produisent de moins en moins de facteurs de croissance (FGF7/10/21, IGF-1) ayant un effet mitogénique sur les TECs^{59,219–223}. De plus, les TECs produisent moins de WNT4, une molécule aux effets paracrines qui contrôle la capacité proliférative des cellules souches de TECs et qui induit l'expression du gène *Foxn1*^{51,52,224}. Cette tendance est également observée pour l'IL-7, une cytokine produite par les cTECs ayant un effet positif sur la thymopoïèse²²⁵. En contrôlant les interactions de type cellule-cellule, les protéines de la matrice extracellulaire des TECs (e. g., laminines, intégrines, cadhérines) sont des éléments essentiels à l'adhésion et à la migration des thymocytes^{226–229}. Par exemple, la surexpression de la protéine matricielle CYR61 augmente non-seulement la prolifération des TECs, mais augmente également leur capacité d'attirer et d'interagir avec les thymocytes²³⁰. Or, la production des protéines de la matrice extracellulaire varie avec l'âge, ce qui pourrait potentiellement influencer l'établissement de réseaux d'interactions fonctionnels entre les TECs et les thymocytes²³¹.

Puisque la composition cellulaire du thymus varie aussi avec l'âge, les TECs deviennent exposées à de nouvelles molécules produites par des populations cellulaires qui émergent suite à l'initiation de l'involution thymique. La production de médiateurs pro-inflammatoires suite à l'adipogenèse thymique représente sans doute l'exemple le plus marquant. D'une part, l'adipogenèse thymique repose sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses thymique en adipocytes²³². Cependant, les TECs peuvent se trans-différencier en adipocytes via une transition épithéliale-mésenchymateuse, ce qui explique bien pourquoi la perte de TECs coïncide avec l'augmentation du tissu adipeux¹⁶⁷. Or, les adipocytes produisent des lipides pro-inflammatoires (cholestérol libre, céramides) qui activent l'inflammasome²³³. Le rôle canonique de ce complexe formé des protéines NLRP3 et ASC est de percevoir différents signaux de danger provenant de cellules ou d'organelles endommagées (ROS, signaux lipo-toxiques)^{234,235}. L'activation de

l'inflammasome induit l'apoptose via l'action de la caspase-1 et mène à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-18) qui induisent l'atrophie thymique²³³. Or, les souris *Nlrp3*-déficientes sont plus résistantes à l'involution thymique²³⁶. En plus des adipocytes, les DCs thymiques acquièrent également un phénotype pro-inflammatoire avec l'âge et produisent davantage d'IL-1¹⁹¹. Ainsi, le vieillissement contribue donc à l'établissement d'un état chronique d'inflammation dans le microenvironnement thymique, ce qui perpétue davantage le stress subi par les TECs.

1.2.1.2.5 Altérations du métabolisme bioénergétique

Les TECs et plus particulièrement les mTEC matures sont hautement actives au point de vue métabolique comparativement à d'autres cellules épithéliales de l'organisme. Tel qu'il sera discuté dans les chapitres suivants, les mTEC matures ont une transcription génique augmentée (Chapitre 2)⁹⁰ et elles utilisent plusieurs machineries cellulaires coûteuses énergétiquement pour assurer la présentation des antigènes du soi à leur surface. Plus important encore, les mTEC matures sont les cellules qui synthétisent le plus de protéines dans le thymus (Chapitre 3)²³⁷. Or, la traduction protéique représente l'un des processus qui demande le plus d'énergie au niveau cellulaire²³⁸. De plus, l'efficacité du métabolisme oxydatif des mitochondries tend à diminuer avec l'âge, ce qui mène à une baisse concomitante de la production d'ATP essentiel à la plupart des processus cellulaires¹⁸⁶. Toutefois, il demeure inconnu si une dysfonction accélérée des mitochondries est observée avec l'âge chez les mTEC matures.

La perte de régulation au niveau de la détection des nutriments est une autre caractéristique associée au vieillissement¹⁸⁶. En accord avec ce concept, l'involution thymique peut être prévenue par la restriction calorique, car les TECs sont particulièrement susceptibles aux dommages induit par le métabolisme aérobie²³⁹. En intégrant la biodisponibilité de divers nutriments et facteurs de croissance, les complexes mTORC1 et mTORC2 sont des régulateurs clés du métabolisme anabolique²⁴⁰. Or, l'absence complète de signalisation de ces complexes individuels dans les TECs induit une hypoplasie thymique modérée à sévère marquée par une perte des TECs^{241,242}. Toutefois, l'hyperactivation de mTOR via l'inactivation de PTEN induit également une atrophie thymique²⁴³. Ces résultats suggèrent donc que les TECs ont besoin de contrôler leur activité métabolique avec justesse afin de maintenir un épithélium thymique fonctionnel.

1.2.1.2.6 Perte de l'homéostasie des protéines

L'homéostasie des protéines, aussi appelée protéostasie, représente l'ensemble des mécanismes cellulaires permettant de préserver la fonctionnalité et l'intégrité du protéome²⁴⁴. Notamment, ces mécanismes sont impliqués dans la synthèse, le repliement, la dégradation, le transport et la sécrétion des protéines, ce qui permet de maintenir l'équilibre entre la production de protéines fonctionnelles et leur élimination²⁴⁴. Un déséquilibre chronique de ce système de contrôle de la qualité des protéines mène inévitablement au stress protéotoxique, qui est caractérisé par une accumulation toxique d'agrégats de protéines mal repliées²⁴⁵. Plusieurs composantes des réseaux de signalisation contrôlant la protéostasie (chaperones, enzymes protéolytiques) peuvent être altérées avec l'âge, ce qui diminue considérablement le pouvoir tampon permettant d'éviter l'apparition de stress protéotoxique²⁴⁶. Or, l'exposition chronique au stress protéotoxique diminue la fonction cellulaire et tissulaire et représente également une caractéristique clinique de plusieurs maladies (e. g., maladies neurodégénératives, diabète, cancer, fibrose)²⁴⁷. Inversement, plusieurs modèles expérimentaux ont démontré que le vieillissement cellulaire peut être ralenti lorsque la fonction des mécanismes contrôlant la protéostasie est augmentée²⁴⁶. Curieusement, les recherches portant sur la régulation de la protéostasie dans le contexte de l'involution thymique sont inexistantes. Cela est d'autant plus surprenant considérant que les cellules épithéliales de la médulla thymique sont reconnues pour avoir un métabolisme des protéines augmentée. Notamment, une analyse par microscopie électronique a révélé que les mTECs ont un réticulum endoplasmique dilaté, de nombreuses vésicules de transport, de multiples complexes de Golgi, de nombreux polyribosomes et plusieurs vacuoles destinées à la sécrétion de protéines²⁴⁸.

Puisque qu'environ le tiers de la synthèse et du repliement des protéines s'effectue dans le réticulum endoplasmique, cette organelle est un élément central de la régulation de la protéostasie^{249,250}. Or, en plus d'une perte de la protéostasie, plusieurs facteurs peuvent induire un stress protéotoxique dans le réticulum endoplasmique (hypoxie, privation nutritive, oxydation des protéines)²⁴⁷. Pour remédier au stress du réticulum endoplasmique, les cellules activent une réponse biochimique rapide connue sous le nom de réponse aux protéines mal-repliées ou réponse UPR. La réponse UPR est un réseau de trois voies de

signalisation principales qui organisent le rétablissement de la protéostasie ou induisent l'apoptose selon l'intensité et la durée du stress (Figure 1.10)²⁴⁹. L'activation des trois médiateurs centraux de la réponse UPR (PERK, IRE1 α , ATF6) mène à la transcription de gènes qui jouent des fonctions clés dans le métabolisme des protéines et le destin cellulaire. En outre, la réponse UPR induit différents systèmes protéolytiques (autophagie, protéasome) et mène à une diminution de la synthèse protéique globale dans le but ultime de réduire la charge protéique intracellulaire²⁴⁷. Si le stress protéotoxique persiste et que la protéostasie ne peut pas être restituée suite à la phase adaptative de la réponse UPR, la cellule active une phase apoptotique afin de prévenir des dommages au niveau tissulaire (Figure 1.10).

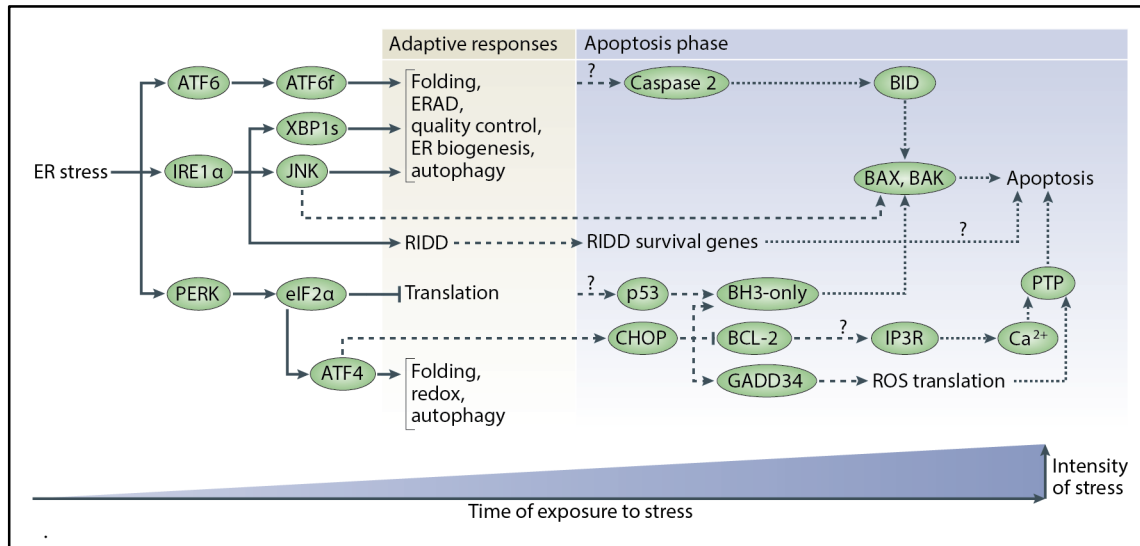


Figure 1.10 Activation de la réponse aux protéines mal-repliées (UPR). Les trois branches de la réponse UPR (PERK, IRE1 α , ATF6) mène à la transcription de gènes impliqués dans le maintien de la protéostasie. Selon l'intensité et la durée d'exposition au stress protéotoxique, la réponse UPR peut passer de la phase adaptative à la phase pro-apoptotique. Reproduit avec la permission de *Nature Publishing Group* (Harper et Bennett²⁴⁴).

1.2.1.3 Rôles physiologiques à l'involution thymique

Les ressources énergétiques doivent être précisément distribuées dans l'organisme pour maintenir l'intégrité et la régénération tissulaire. D'autres processus physiologiques tels que la régulation de la température corporelle, la croissance et la reproduction requièrent également de grande quantité d'énergie¹³⁷. Or, avec une efficacité de moins de 5%, le thymus est un organe extrêmement coûteux d'un point de vue bioénergétique²⁵¹. Il n'est donc pas surprenant que le thymus s'atrophie rapidement lorsque les apports nutritionnels sont sous-optimaux²⁵². Ainsi, une théorie propose qu'une fois l'immunité adaptative créée, l'involution thymique serait nécessaire pour prioriser l'énergie pour des fonctions essentielles à la survie de l'organisme et de l'espèce¹³⁷. En effet, la thymectomie (exérèse chirurgicale du thymus) a peu d'effet sur l'espérance de vie lorsqu'elle est pratiquée chez des individus adultes¹³⁷. La grossesse est sans doute le processus physiologique qui demande la plus grande quantité d'énergie. Or, une involution thymique aiguë réversible survient lors de la grossesse²⁵³. En plus de permettre une redistribution efficace de l'énergie¹⁹⁵, le rôle physiologique présumé de l'involution thymique induite par la grossesse est d'augmenter la fertilité via une tolérance maternelle aux antigènes du fœtus¹⁹⁵. En effet, les souris femelles transplantées avec un thymus exprimant une forme inactive du récepteur de la progestérone ont des portées beaucoup plus petites et davantage d'embryons qui ne se développent pas complètement¹⁵³. Avec l'âge, les cellules souches hématopoïétiques qui ont pour origine la moelle osseuse produisent moins de précurseurs lymphoïdes qui peuvent migrer dans le thymus²⁵⁴. De plus, la durée moyenne du séjour des thymocytes en développement dans les différentes niches du thymus est augmentée avec l'âge²⁵⁵. Cependant, une fois qu'une mémoire immunologique est établie, il n'est plus indispensable que les taux de prolifération des thymocytes soient très élevés. Il a donc été proposé qu'une diminution de l'activité thymopoïétique est nécessaire pour limiter le potentiel prolifératif des thymocytes afin d'éviter que le thymus devienne un microenvironnement pro-leucémique^{256,257}.

Malgré le fait que l'involution thymique soit un processus physiologique conservé chez les vertébrés, nous ignorons toujours si ses effets positifs ont plus d'influence que les risques immunologiques y étant associés.

1.2.2 Involution thymique âge-indépendante

En plus de l'atrophie thymique dépendante de l'âge, plusieurs types de perturbations affectant la thymopoïèse peuvent exercer des effets négatifs sur l'homéostasie des TECs (e. g., chimiothérapie, radiothérapie, infections, glucocorticoïdes, stress psychologique, malnutrition)²⁵⁸. La plupart de ces facteurs affectent la survie des thymocytes et leur impact sur les TECs est donc indirecte et principalement due à une perte d'interactions bidirectionnelles entre thymocytes et TECs³⁸. Malgré une sensibilité marquée du thymus pour différents types de stress ou d'interventions médicales, une régénération endogène du thymus est parfois observée une fois la source de stress éliminée⁴². En plus de cibler les cellules cancéreuses, les thérapies de cytoablation (e. g., chimiothérapie, radiothérapie) sont extrêmement toxiques pour le système hématopoïétique, y compris les thymocytes en développement²⁵⁹. En contexte clinique, les patients cancéreux et ceux transplantés avec des cellules souches hématopoïétiques de donneurs allogéniques subissent des dommages aigus au thymus en raison de la chimiothérapie ou radiothérapie pratiquée au préalable. Ces effets peuvent notamment être amplifiés par des infections opportunistes chez ces patients immunosupprimés. En effet, le thymus n'est pas prémuni contre les réponses infectieuses et cet organe peut être la cible de plusieurs agents pathogènes (virus, bactéries, parasites) qui affecte sa structure et sa fonction²⁶⁰. L'épithélium thymique utilise même un mécanisme de protection qui repose sur l'action du *miR-29a* pour diminuer la sensibilité du thymus à s'atrophier en présence d'agents infectieux²⁶¹. La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) est une autre complication de la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques qui accentue la susceptibilité à l'involution thymique aiguë. Bien que la GVHD soit davantage observée au niveau de l'intestin, du foie et de la peau, plusieurs manifestations cliniques montrent que le thymus est un site particulièrement sensible aux lymphocytes T allogéniques²⁶². De plus, puisque les corticostéroïdes sont régulièrement utilisés comme première ligne de traitement pour la GVHD et qu'ils induisent une involution thymique, cela ajoute aux effets négatifs de la GVHD sur la fonction du thymus²⁶³.

1.3 Objectifs de la thèse

Au fil des années, plusieurs études ont montré que les mTECs expriment une vaste gamme d'antigènes du soi via l'EGP. Or, il est atypique pour une population cellulaire d'avoir un dosage génique aussi élevé. Cependant, les mécanismes permettant aux mTECs de faire face à ce phénomène demeurent inconnus. Nous avons donc été les premiers à proposer que l'EGP pourrait représenter un défi majeur pour la maintenance de la protéostasie chez les mTECs. Effectivement, en assumant que tous les gènes ectopiques sont traduits en protéines chez les mTECs, ces dernières doivent faire face à une concentration intracellulaire anormalement élevée en protéines⁹⁰. Nous avons donc émis l'hypothèse que les mTECs devaient avoir un potentiel augmenté à maintenir la protéostasie, ce qui leur permettrait d'éviter de surcharger la capacité du réticulum endoplasmique à replier les protéines^{90,237}.

1.3.1 Objectif général

L'objectif général de cette thèse est d'élucider le ou les facteurs étiologiques principaux à l'involution thymique. Dans nos efforts de mieux comprendre ce phénomène, nous avons évalué si l'EGP, une propriété intrinsèque des mTECs, représentait une source chronique de stress pouvant accélérer le vieillissement thymique.

1.3.2 Objectifs spécifiques

Objectif 1 : Caractériser l'étendue d'EGP chez les mTECs au niveau transcriptionnel (Chapitre 2).

Objectif 2 : Évaluer l'effet de l'EGP chez les mTECs au niveau traductionnel (Chapitre 3).

Objectif 3 : Identifier des régulateurs de la protéostasie chez les mTECs et évaluer leur implication dans l'initiation de l'involution thymique (Chapitre 3).

CHAPITRE 2

2. Differential features of AIRE-induced and AIRE independent promiscuous gene expression in thymic epithelial cells

Charles St-Pierre^{*,†}, Assya Trofimov^{*,†,‡}, Sylvie Brochu^{*,†}, Sébastien Lemieux^{*,‡}
and Claude Perreault^{*,†,2}

^{*}Institute for Research in Immunology and Cancer, [†]Department of Medicine, and
[‡]Department of Computer Science and Operations Research, Université de Montréal,
Montreal, QC, Canada H3C 3J7

²CORRESPONDENCE: Claude Perreault (claudio.perreault@umontreal.ca), Institute for
Research in Immunology and Cancer, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, QC,
Canada, H3C 3J7. Phone : 514-343-6126 ; Fax : 514-343-5839

Journal of Immunology, Volume 195, pages 498-506, June 1st, 2015

2.1 Présentation de l'article #1

Le point de contrôle majeur que doivent traverser les thymocytes dans la médulla thymique consiste à distinguer le soi du non-soi. La tolérance au soi immunitaire sert à éliminer les thymocytes auto-réactifs et permet aux thymocytes tolérants au soi de migrer hors du thymus pour remplir leurs fonctions effectrices. Cette tolérance au soi est un processus absolument vital qui repose sur une propriété distinctive des mTECs, soit l'expression génique promiscuitaire ou l'EGP. Grâce à l'EGP, les mTECs peuvent exprimer la quasi-totalité des gènes codant pour des protéines et ainsi induire une tolérance pour la grande majorité des antigènes présents dans l'organisme.

Au moment d'initier ce projet, le régulateur auto-immun AIRE était le seul régulateur transcriptionnel reconnu pour contrôler l'EGP, autant chez l'humain que chez la souris. Or, cette découverte a mené à une série d'articles visant à étudier l'EGP AIRE-dépendante par des approches de micro-puces à ARN. Ces méthodes ont notamment permis de détecter dans les mTECs plusieurs transcrits illégitimes AIRE-dépendants dont l'expression est normalement restreinte à des tissus extra-thymiques. Toutefois, puisque la vaste majorité de ces gènes sont très faiblement exprimés dans une population hétérogène de mTECs, nous avons décidé d'analyser l'étendue de l'EGP dans les mTECs avec une technique beaucoup plus précise. Comparativement aux micro-puces à ARN, le séquençage de l'ARN à haut débit (RNA-seq) est une technique qui possède une plus grande sensibilité, un intervalle de détection plus large et des variations techniques plus faibles. En utilisant le RNA-seq plutôt que les micro-puces à ARN, nous avons émis l'hypothèse que l'EGP avait un effet beaucoup plus vaste que précédemment anticipé sur le transcriptome des mTECs.

Pour étudier l'EGP AIRE-dépendante, nous avons utilisé deux cohortes de souris. Premièrement, des souris sauvages (WT) qui produisent la protéine AIRE dans les mTEC matures et des souris *Aire*-déficientes (*Aire*-KO) obtenues par les mêmes croisements. Chez les souris *Aire*-KO, des portions des exons 1 à 3 du gène *Aire* ont été excisées, ce qui empêche la production de la protéine AIRE dans les mTEC matures. Nous avons isolé le thymus de ces souris puis trié par cytométrie en flux trois populations de cellules primaires : les cTECs, les mTEC immatures (mTEC^{lo}) et les mTEC matures (mTEC^{hi}). Nous avons

réalisé le RNA-seq sur trois répliques biologiques pour chaque population cellulaire isolée de souris WT ou *Aire*-KO. Finalement, nous nous sommes intéressé plus particulièrement à deux paramètres de nos analyses RNA-seq : (1) le nombre total de gènes exprimés dans chaque population cellulaire et (2) le nombre de gènes dont l'expression est contrôlée par AIRE de façon intrinsèque.

Trois conclusions majeures sont ressorties de nos données RNA-seq. Premièrement, nous avons démontré que AIRE a un impact sélectif sur le programme transcriptionnel des mTEC^{hi} et que le niveau d'EGP est donc maximal chez cette population cellulaire. Deuxièmement, chez les mTEC^{hi}, AIRE agit presque toujours comme un activateur transcriptionnel plutôt que d'un répresseur transcriptionnel. Finalement, nous avons découvert que la protéine AIRE avait un impact beaucoup plus grand que précédemment anticipé sur le transcriptome des mTEC^{hi}. En effet, nos résultats ont montré que AIRE possède une signature transcriptionnelle de plus de 3,000 gènes et contrôle ainsi l'expression d'au moins 14% de tous les gènes chez la souris⁹⁰.

2.2 Contributions des auteurs

CSP: Conception du design expérimental, planification et exécution des expériences, analyse et discussion des résultats, préparation de toutes les figures (Figures 2.1 à 2.6 et Supplemental Figures 2.S1 à 2.S4) et écriture du manuscrit

AT: Analyse des données RNA-seq et programmation de codes bio-informatiques pour l'analyse de la spécificité tissulaire d'auto-antigènes (Figure 2.4C, Supplemental Figure 2.S4A) et révision du manuscrit

SB: Discussion générale et révision du manuscrit

SL: Analyse des données RNA-seq et programmation de codes bio-informatiques pour l'analyse de l'épissage alternatif (Figure 2.4E et Supplemental Figure 2.S3D, E) et révision du manuscrit

CP: Planification, analyse des résultats, discussion générale et écriture du manuscrit

2.3 Abstract

Establishment of self-tolerance in the thymus depends on promiscuous expression of tissue-restricted Ags (TRA) by thymic epithelial cells (TEC). This promiscuous gene expression (pGE) is regulated in part by the autoimmune regulator (AIRE). To evaluate the commonalities and discrepancies between AIRE-dependent and –independent pGE, we analyzed the transcriptome of the three main TEC subsets in wild type and *Aire* knockout mice. We found that the impact of AIRE-dependent pGE is not limited to generation of TRA. AIRE decreases, via non-cell autonomous mechanisms, the expression of genes coding for positive regulators of cell proliferation, and it thereby reduces the number of cortical TEC. In mature medullary TEC, AIRE-driven pGE upregulates non-TRA coding genes that enhance cell-cell interactions (e. g., claudins, integrins and selectins) and are probably of prime relevance to tolerance induction. We also found that AIRE-dependent and –independent TRA present several distinctive features. In particular, relative to AIRE-induced TRA, AIRE-independent TRA are more numerous and show greater splicing complexity. Furthermore, we report that AIRE-dependent vs. -independent TRA project nonredundant representations of peripheral tissues in the thymus.

2.4 Introduction

In all gnathostomes, thymic function and architecture are remarkably conserved and the thymus is the sole organ able to produce classic T cells^{1,2}. Although the thymic cortex is necessary for thymocyte expansion and positive selection, the primary role of the thymic medulla is in the generation of self-tolerance via negative selection and the generation of regulatory T cells³⁻⁵. Failure to establish or maintain self-tolerance causes autoimmunity, which has a major impact on human health. Classic autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, type 1 diabetes and multiple sclerosis affect about 4% of the general population⁶. Induction of so-called “central tolerance” in the thymic medulla depends on ectopic expression of proteins otherwise restricted to differentiated organs in the periphery⁷. Remarkably, the medullary thymic epithelial cell (mTEC) population collectively expresses almost the entire repertoire of known protein-coding genes^{8,9} and can therefore induce tolerance to a wide array of tissue-restricted Ags (TRA). Promiscuous gene expression (pGE) by mTEC is essential to induce tolerance to protein whose expression otherwise would be strictly extrathymic.

Although pGE evolved as a fascinating strategy for enhancing the scope of self-tolerance, the mechanisms underpinning this crucial process are still poorly defined. To date, the only known molecular determinant driving pGE in the thymus is the autoimmune regulator (AIRE), a transcriptional regulator that does not act as a conventional transcription factor¹⁰⁻¹². AIRE interacts with repressive epigenetic marks and recruits proteins that promote transcriptional elongation and pre-mRNA processing^{13,14}. In addition to its role in promoting the expression of TRA for the purpose of negative selection¹⁰, AIRE also affects mTEC development¹⁵, enhances Ag presentation to thymocytes¹⁶ and regulates Ag transfer from mTEC to dendritic cells (DCs)¹⁷. However, the molecular mechanisms underlying these effects are still unknown. Furthermore, AIRE regulates the pGE of only a fraction of TRA¹⁸. The identity of transcriptional regulators driving AIRE-independent pGE and their functional significance remain elusive.

The goal of our work was therefore to address two questions. First, irrespective of its role in the generation of TRA, how might AIRE affect TEC function? Second, what are the

commonalities and discrepancies between AIRE-dependent and -independent pGE? To this end, we used high-throughput RNA-sequencing (RNA-seq) to analyze the poly(A)⁺ transcriptome of the three main TEC populations in wild type (WT) and *Aire* knockout (KO) mice. We found that AIRE has pervasive effects not only on mTEC but also on cortical TEC (cTEC) biology. Furthermore, we report that AIRE-dependent vs. -independent TRA present several differential features and project nonredundant representations of peripheral tissues in the thymus.

2.5 Material and Methods

2.5.1 Mice

B6.129S2-Aire^{tm1.1Doi}/J mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor). Heterozygous mice (*Aire*^{+/-}) were mated and 6-8 wk-old homozygous littermates (*Aire*^{+/+} and *Aire*^{-/-} mice) were used in all experiments. B6.129S2-Aire^{tm1.1Doi}/J mice were bred and housed under specific-pathogen-free conditions in sterile ventilated racks at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC). All procedures were in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Comité de Déontologie et Expérimentation Animale de l'Université de Montréal.

2.5.2 Flow cytometry analyses and cell sorting

Thymi were isolated and stromal cell enrichment was performed as described¹⁹. In brief, thymi were mechanically disrupted and digested with DNase I (Sigma-Aldrich) and Liberase (Roche). Thymic stromal cells were either further enriched using anti-CD45 Microbeads (Miltenyi Biotec) or stained directly with biotinylated *Ulex europaeus* lectin 1 (UEA1; Vector Laboratories), PE-Cy7 conjugated streptavidin (BD Biosciences) and the following Ab: Alexa Fluor 700 anti-CD45, PE anti-I-A^b, FITC anti-CD80 (BD Biosciences), allophycocyanin-Cy7 anti-EpCAM, Alexa Fluor 647 anti-Ly51 (Bio Legend). Cell viability was assessed using 7-aminoactinomycin D (BD Biosciences). Isolation of TEC subsets was performed as previously described^{8,20}. Live TEC were selected as 7-aminoactinomycin D⁻CD45⁻EpCAM⁺ and sorted as cTEC (Ly51⁺UEA1⁻), mTEC^{lo} (Ly51⁻UEA1⁺CD80^{lo}MHC class II [MHC II]^{lo}), and mTEC^{hi} (Ly51⁻UEA1⁺CD80^{hi}MHC II^{hi}). For intracellular staining, cell viability was assessed using the Live/Dead fixable blue dead cell Stain kit (Invitrogen) and cells were fixed/permeabilized using the Foxp3 staining buffer set (eBioscience) and stained with eFluor660 anti-AIRE Ab (eBioscience). TEC were sorted on a three-laser FACSARIA (BD Biosciences) or analyzed on a three-laser LSR II (BD Biosciences) using FACSDiva software.

2.5.3 RNA extraction and cDNA libraries preparation

Total RNA was isolated using TRIzol as recommended by the manufacturer (Invitrogen), and then further purified using the RNeasy micro kit (Qiagen). Sample quality was assessed using Bioanalyzer RNA Pico chips (Agilent Technologies). A minimum of 10,000 cells were used for the RNA-seq experiment (average of 20,000 cells), yielding an average of ~20 ng total RNA. Transcriptome libraries were generated from total extracted RNA using the TruSeq RNA sample prep kit (v2) (Illumina) following the manufacturer's protocols.

2.5.4 RNA-seq

RNA-seq was performed as described⁸. Briefly, paired-end (2 x 100bp) sequencing was performed using the Illumina HiSeq 2000 machine running TruSeq v3 chemistry. Three RNA-seq libraries were sequenced per lane (eight lanes per slide). Detail of the Illumina sequencing technologies can be found at <http://www.illumina.com/applications/sequencing/rna.html>. Data were mapped to the *Mus musculus* (mm10) reference genome using the ELANDv2 alignment tool from the CASAVA 1.8.2 software or TopHat/Cufflinks 2.2.1 for analyses at the isoform transcript level. Keeping only uniquely matching reads, we used the read count per transcript for the identification of differentially expressed genes. We then used the statistical method based on a negative binomial distribution and implemented in the DESeq package for R to compare samples and obtain a robust measure of differential expression between samples^{21,22}. The resulting *p* values were adjusted for multiple testing with the Benjamin-Hochberg procedure to yield *p-adj* values. To estimate gene expression, we quantified transcript levels as reads per kb of exon model per million mapped reads (RPKM)²³. RNA-seq data have been deposited in Gene Expression Omnibus archives under accession number GSE65617.

2.5.5 Gene ontology analyses

Input gene datasets were tabulated and uploaded into the bioinformatics resource DAVID v6.7. This online tool was used to assess the enrichment of input genes with gene ontology (GO) biological process terms^{24,25}. We used all genes of the mouse genome as background and considered a p value of < 0.05 to be significant. Only nonredundant biological processes with significant enrichment were investigated.

2.5.6 Statistical and bioinformatics analyses

Statistical tests and bioinformatics analyses were done using R version 3.1.0 or Excel version 14.4.7. Unless stated otherwise, data are represented as mean \pm SD. Statistical significance was assessed by a two-tailed Student t test unless stated differently and differences with a p value < 0.05 were considered significant. Splicing complexity was measured by the Shannon-Entropy of the relative isoform abundances of genes with more than one detectable isoform. Splicing complexity was calculated for each gene as:

$$-\sum_{i=1}^n P_i \log_2(P_i)$$

where n is the number of detectable isoforms per gene and P the proportion contribution of each isoform i to total gene expression. Genes with no complexity have a single detectable isoform whereas genes with equally abundant isoforms have maximal complexity.

2.6 Results

2.6.1 Dynamics of TEC populations in WT and Aire-deficient mice

As a prelude to transcriptomic analyses, we assessed the size of the main TEC subsets in 6-8 wk-old WT and *Aire*^{-/-} littermates. TEC (EpCAM⁺CD45⁻) were defined as cTEC and mTEC based on the expression of Ly51 and binding of the UEA1 lectin^{8,20}. mTEC were further divided into mTEC^{lo} and mTEC^{hi} based on low or high expression of CD80 and MHC II molecules (Figure 2.1A, Supplemental Figure 2.S1).

Aire is expressed strictly in mTEC^{hi}²⁶ and modulates mTEC differentiation¹⁵. In accordance with this, we observed that, relative to their WT littermates, *Aire*-KO mice displayed a significant increase in the absolute number of mTEC^{hi} whereas the number of mTEC^{lo} remained unchanged (Figure 2.1B, Supplemental Figure 2.S2). Consequently, the proportion of mTEC^{lo} and mTEC^{hi} was also severely altered in KO mice (Figure 2.1C). Nonetheless, the unexpected finding was a 1.6-fold increase in the absolute number of cTEC in KO mice (Figure 2.1B). AIRE's impact on cTEC number is non-cell autonomous because cTEC do not express the AIRE protein²⁶.

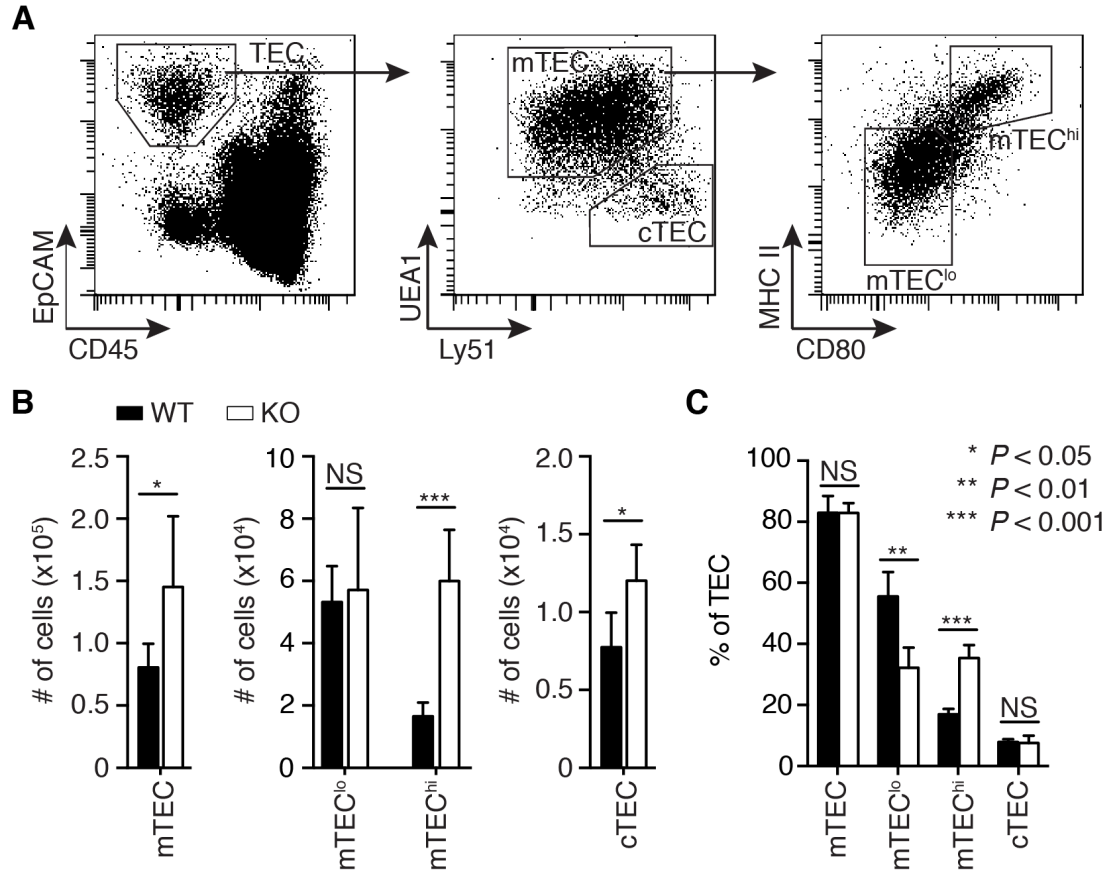


Figure 2.1 | Flow cytometry analysis of TEC population in WT and Aire-deficient mice. (A) Representative flow cytometry profiles with gating strategy for TEC subsets are shown. TEC were defined as CD45⁻ EpCAM⁺ and further divided into cTEC (Ly51⁺ UEA1⁻) and mTEC (Ly51⁻ UEA1⁺). Immature and mature mTEC (mTEC^{lo} and mTEC^{hi}) were discriminated based on low or high expression of CD80 and MHC II molecules. (B) Absolute cell number and (C) proportion of TEC subsets in WT and Aire-KO mice. Each group includes 4 to 6 mice (two independent experiments). Error bars indicate SD and stars represent the *P* values calculated using a two-tailed Student's *t* test.

2.6.2 AIRE has non-cell autonomous effects on the cTEC transcriptome

We performed RNA-seq analyses on three biological replicates for each cell type. Each replicate contained pooled FACS-sorted TEC from four (two males plus two females) 6- to 8-wk-old WT or *Aire* knockout littermates (Figure 2.2A). The purity of sorted TEC subsets was > 97% (Figure 2.2B). To further validate the purity of the sorted primary TEC populations, we confirmed that they expressed expected markers of cTEC and mTEC (Figure 2.2C). Note that *Aire* was also detected in *Aire*^{-/-} mice, because only exon 2 and portions of introns 1 and 3 are excised in B6.129S2-*Aire*^{tm1.1Doi}/J mice.

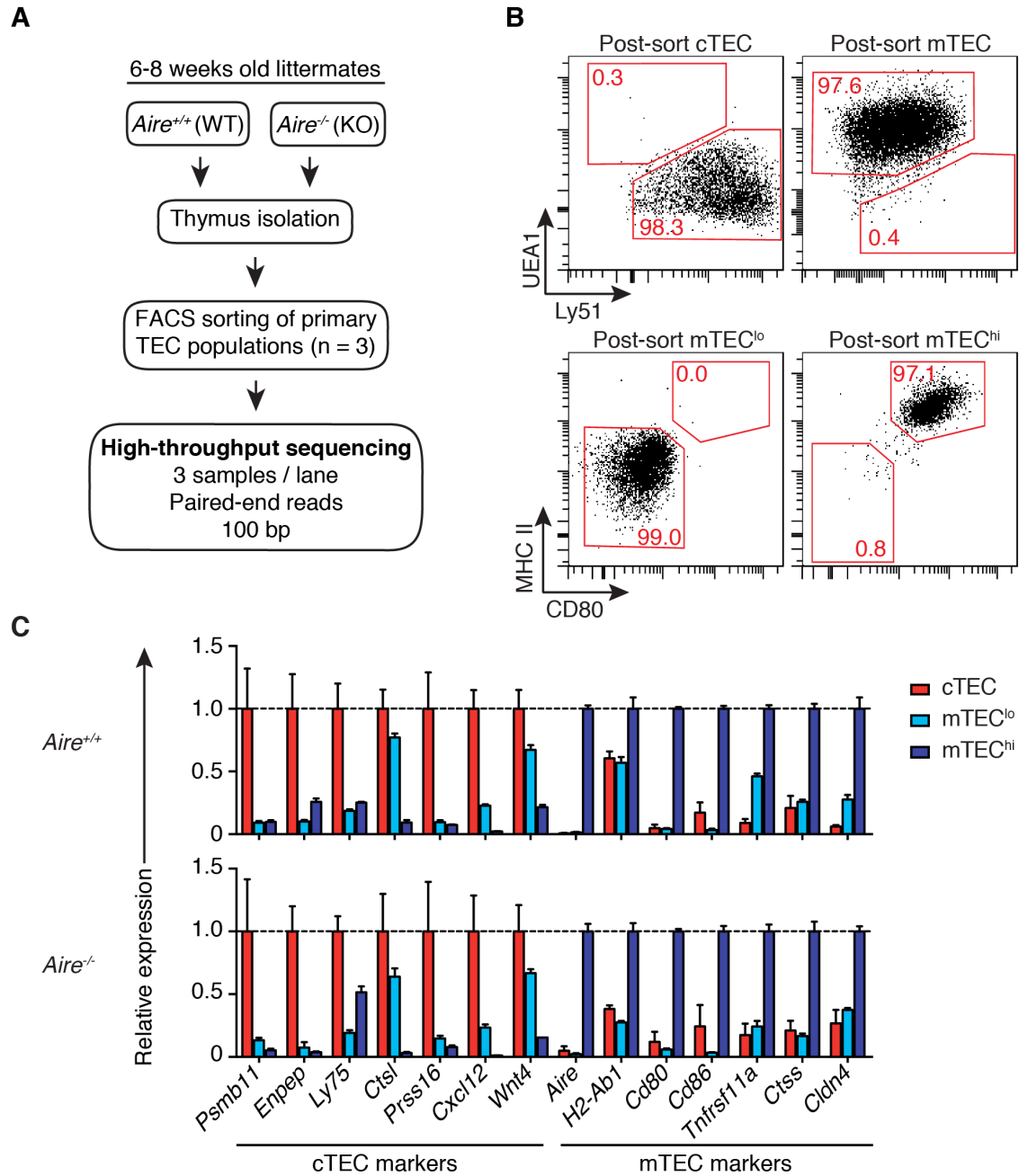


Figure 2.2 | RNA-seq of primary cTEC, mTEC^{lo}, and mTEC^{hi} harvested from WT and Aire-deficient mice. (A) RNA-seq study design. (B) Postsorting purity of sorted TEC populations. (C) Relative mRNA expression of cTEC lineage-specific genes (normalized to cTEC) and mTEC lineage-specific genes (normalized to mTEC^{hi}) in WT and KO mice.

To gain insights into the impact of AIRE on cTEC, we compared the transcriptome of FACS-purified WT vs. KO cTEC. For analysis of differentially expressed genes (DEGs), we used the *R* package DESeq²¹ together with stringent criteria: a fold-difference ≥ 5 between WT and KO and a *p*-adj < 0.05. We identified a total of 309 genes that were upregulated in KO cTEC while only 9 were upregulated in WT cTEC (Figure 2.3A). Of note, it is formally possible that gene expression changes in *Aire*-KO cTEC reflect a subset-specific gene upregulation, which cannot be distinguished with bulk RNA-seq. Addressing this issue in future studies would therefore require single cell approaches. To better characterize the set of genes modulated by AIRE in cTEC, we performed a GO term enrichment analysis on genes overexpressed in KO cTEC that showed a minimum of 1 RPKM (215 out of 309 genes). Genes overexpressed in KO cTEC were associated with 10 main biological processes (Figure 2.3B). We analyzed more in depth the three biological processes associated with the highest number of DEGs: epithelial cell differentiation, defense response, and regulation of cell proliferation. The most significantly enriched term in our gene list was epithelial cell differentiation. Of particular relevance, we found that several genes encoding small proline-rich (SPRR) proteins, including *Sprrr1a*, *Sprrr2d*, *Sprrr2j-ps* and *Sprrr4*, were upregulated in KO cTEC as compared to WT littermates. The *Sprrr* multigene family is instrumental in the formation of a cornified envelope (CE), which serves as a protective barrier in various stratified squamous epithelia²⁷. Moreover, we observed that genes encoding CE structural proteins including involucrin, cornifelin and cytokeratin 4, were also upregulated in KO cTEC^{28,29}. Taken together, these results suggest that *Aire*^{-/-} cTEC acquire a more differentiated phenotype by upregulation of genes involved in CE formation.

Among DEGs associated to the GO term “defense response”, we found several chemokines (*Ccl8*, *Ccl24*) and ILs (*Il10*, *Il23a* and *Il25*). Whereas *Il23* contributes to TEC regeneration³⁰, the impact that other DEGs from this group may have on cTEC biology has yet to be elucidated. Finally, we observed that AIRE was predicted to affect cTEC proliferation (Figure 2.3B). Notably, the epithelial mitogen (*Epgn*) and homeobox A13 (*Hoxa13*) genes were both upregulated in KO cTEC. Likewise, *Fgf10* which enhances TEC proliferation³¹, was upregulated in KO cTEC. Upregulation of positive regulators of epithelial cell proliferation in *Aire*-KO cTEC (Figure 2.3B) is consistent with and provides

a plausible mechanistic explanation for the increased numbers of cTEC in *Aire*^{-/-} mice (Figure 2.1B).

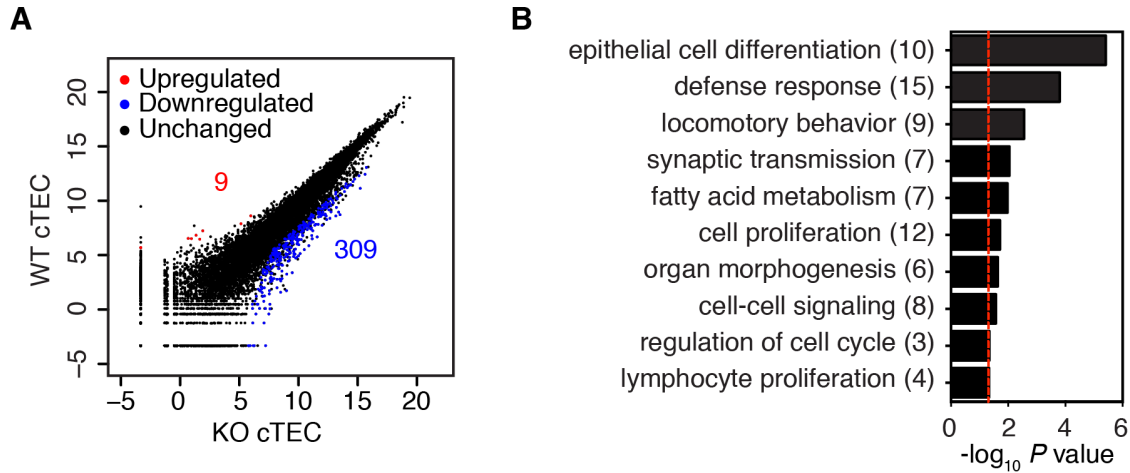


Figure 2.3 | Transcriptome of WT and Aire-KO cTEC. (A) Scatter plot representation of gene expression levels in WT and KO cTEC. Data represent the mean of normalized counts. Genes with fold difference ≥ 5 and $p\text{-adj} < 0.05$ between WT and KO mice were considered as DEGs (red and blue dots). (B) Histogram shows enriched biological processes ($p < 0.05$; red line) linked to DEGs overexpressed in KO cTEC. Numbers in parentheses indicate the number of DEGs per category. GO term enrichment analysis was performed with DAVID bioinformatic tools.

2.6.3 Impact of AIRE on pGE

Because individual TRA are expressed in only a fraction of mTEC at any given time^{9,32,33}, we performed our transcriptomic studies at high sequencing depth (average of 134×10^6 mapped reads/sample) to enable robust detection of low abundance transcripts. Hierarchical clustering based on global gene expression levels revealed that WT mTEC^{hi} were distinct from all other TEC populations (Supplemental Figure 2.S3A). *Aire* deletion significantly reduced the total number of expressed genes (RPKM > 1) in mTEC^{hi} but not in mTEC^{lo} or cTEC (Supplemental Figure 2.S3B, C). In total, 15,137 protein-coding genes were detected in WT mTEC^{hi} whereas 12,684 were detected in KO mTEC^{hi}, similar to what we observed in other TEC populations (12,636 genes). KO mTEC^{hi} fell in a discrete cluster, halfway between WT mTEC^{hi} and other TEC subsets, suggesting that KO mTEC^{hi} retain an AIRE-independent mTEC^{hi} identity (Supplemental Figure 2.S3A). Finally, both cTEC and mTEC^{lo} from WT and KO mice generated additional clusters, indicative of a lesser impact of *Aire* deletion in these cells.

To identify genes regulated in a cell autonomous manner by AIRE, we analyzed DEGs between WT vs. KO mTEC^{hi} (fold difference ≥ 5 and $p\text{-adj} < 0.05$). Of a total of 3,338 AIRE-regulated genes (Figure 2.4A), 3,272 genes were upregulated in WT mTEC^{hi} (AIRE-induced) whereas only 66 genes were upregulated in KO mTEC^{hi} (AIRE-repressed). Two points can be made from these results. First, AIRE almost always act as a transcriptional activator rather than a repressor in mTEC^{hi}. This is in stark contrast to the non-cell autonomous effect of AIRE on cTEC where the vast majority of genes are upregulated in *Aire*-KO relative to WT cTEC (Figure 2.3A). Second, AIRE-induced genes include at least ~14% of all mouse genes.

AIRE is not expressed in the mTEC^{lo} subset, which contains most immature “pre-AIRE” cells and a minority of “post-AIRE” cells³⁴. Accordingly, we found only minimal differences between the transcriptome of WT and KO mTEC^{lo} (Figure 2.4B). Out of 101 genes overexpressed in WT relative to KO mTEC^{lo}, the vast majority (90 genes) were among the 3,272 AIRE-induced genes identified in mTEC^{hi} (data not shown). This is consistent with the notion that post-AIRE mTEC may maintain expression of some AIRE-

induced TRA³⁴. However, that we could detect only 2.8% (90 out of 3,272) of AIRE-induced genes in the mTEC¹⁰ subset casts some doubt on the biological role of post-AIRE cells in establishment of central tolerance to AIRE-dependent TRA. Nevertheless, we must not discount the possibility that post-AIRE cells may still present MHC-peptide complexes that have a long half-life and persist at the cell surface in the absence of the peptide (i. e., TRA) coding transcript.

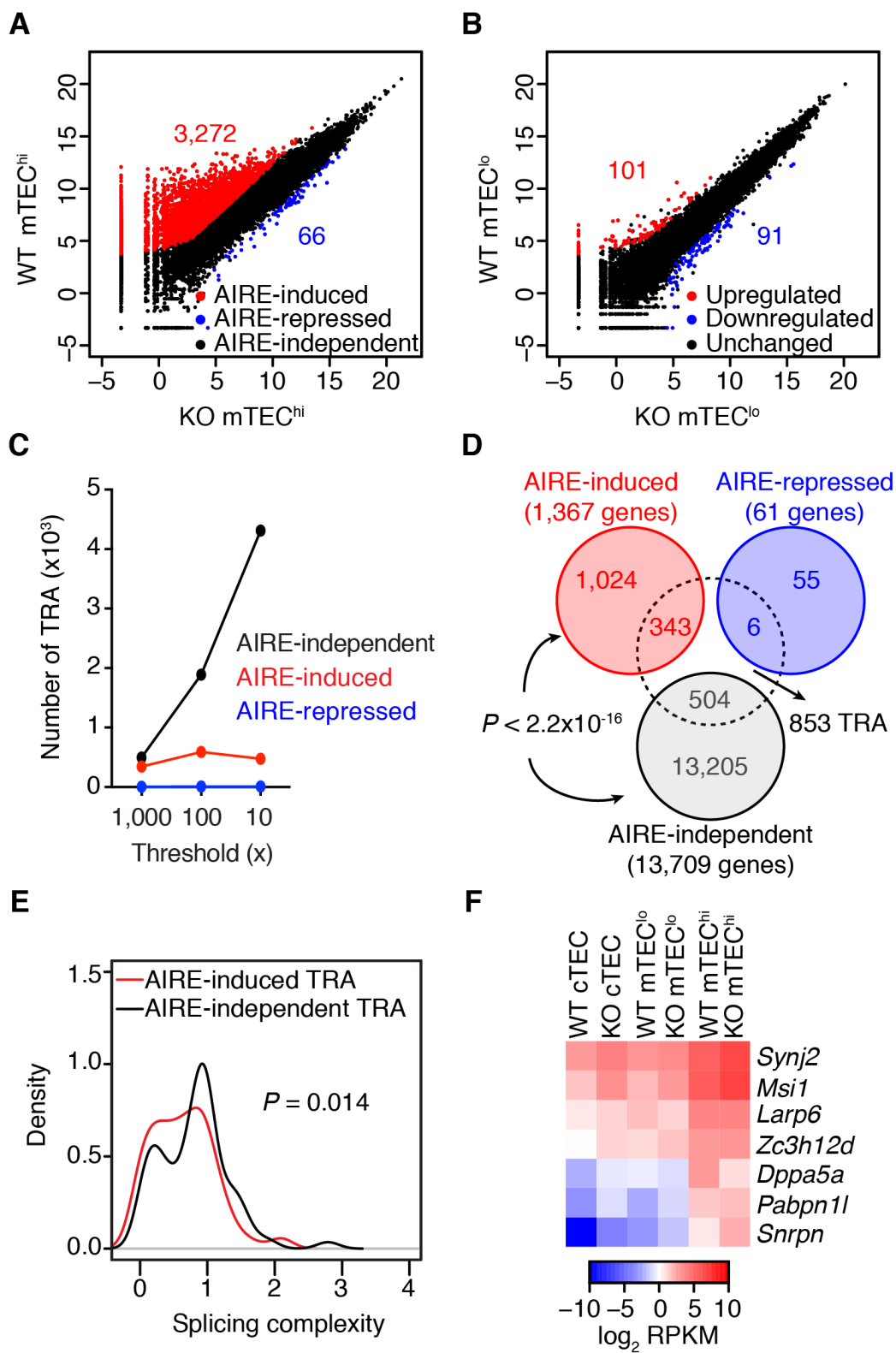


Figure 2.4 | The transcriptome of WT versus Aire-KO mTEC subsets reveals the breadth of pGE. (A and B) Transcriptome of WT versus Aire- KO (A) mTEC^{hi} and (B) mTEC^{lo}. Genes with fold change ≥ 5 and $p\text{-adj} < 0.05$ between WT (y-axis) and KO (x-axis) were considered as differentially expressed (red and blue dots). Data are represented in a scatter plot as mean of normalized counts. No RPKM threshold was used in these plots. In (C)–(F), only genes with RPKM of > 1 were considered. (C) Number of AIRE-induced (red), AIRE-repressed (blue), and AIRE-independent (black) TRA detected in mTEC^{hi} using various thresholds of tissue-specificity (Supplemental Figure 2.S4A). (D) Proportion of TRA in AIRE-induced, -repressed, and -independent genes. (E) Splicing complexity of AIRE-induced (red) and AIRE-independent (black) multi-isoform TRA-encoding genes. The Wilcoxon rank sum test was used to statistically assess the difference in splicing complexity. (F) Expression heat map of AIRE-independent mRNA processing factors upregulated in mTEC^{hi} relative to mTEC^{lo} and cTEC.

2.6.4 AIRE-induced versus –independent TRA

Aire-KO mice certainly facilitate the identification of AIRE-dependent genes. However, definition of TRA, and in particular AIRE-independent TRA, is a more complex question. We adopted the definition stipulating that TRA-coding genes are those that are tissue-enriched (i.e., expressed at relatively high levels) in at most five tissues³⁵. To identify these genes, we used a comprehensive catalogue of gene expression in various tissues of C57BL/6 mice (GSE10246)³⁶. We then had to select a relative expression threshold to define tissue enrichment. The impact of this criterion is illustrated for two canonical TRA (*Ins2* and *Crp*) (Supplemental Figure 2.S4A). When we adopt a stringent criterion for tissue enrichment (expression level in a given tissue \geq 1,000-fold the median expression across all tissues), both *Ins2* and *Crp* qualify as TRA. However, when we use a less stringent threshold (\geq 10-fold), *Ins2* no longer qualifies as a TRA because it is then considered to be enriched in more than five tissues. Consistent with this, we found that the enrichment threshold could have a major influence on the number of TRA detected in mTEC^{hi}. Whereas the number of AIRE-induced TRA remained stable at different thresholds, the number of AIRE-independent TRA increased dramatically when lowering the stringency (Figure 2.4C). We reasoned that if we wanted to analyze the characteristics of AIRE-independent TRA, it was preferable to favour robustness over sensitivity. We therefore selected the most stringent threshold (1,000-fold) for further analyses.

First, we validated that our TRA list included known AIRE-induced and AIRE-independent TRA (Supplemental Figure 2.S4B). It has been shown that the degree of pGE conforms to the following hierarchy: mTEC^{hi} > mTEC^{lo} > cTEC^{9,18}. We therefore validated the expression pattern of our TRA in TEC populations. Although AIRE-induced TRA were solely expressed in WT mTEC^{hi}, AIRE-independent TRA were predominantly expressed in mTEC^{hi}, but also detectable in mTEC^{lo} and cTEC (Supplemental Figure 2.S4C).

Using our list of TRA, we next assessed to what extent AIRE-induced vs. AIRE-independent transcription contributes to the pool of TRA expressed in mTEC^{hi}. When considering genes with RPKM > 1, we found that out of the 1,367 AIRE-induced genes, 343 (25%) encoded TRA. In contrast, 504 (3.7%) of the 13,709 AIRE-independent genes

encoded TRA (Figure 2.4D). Finally, only 6 genes fell into the AIRE-repressed category. Two points can be made from these data. First, most AIRE-induced genes are not TRA. Second, although AIRE-induced genes are enriched in TRA ($p < 2.2 \times 10^{-16}$), ~60% of total TRA detected in mTEC^{hi} were AIRE-independent.

Evidence suggests that AIRE plays a role in mRNA processing and contributes to the expression of tissue-specific isoforms in mTEC^{37,38}. We therefore analyzed mRNA splicing in TEC population harvested from WT and KO mice (Supplemental Figure 2.S3D, E). We found that WT mTEC^{hi} had a higher splicing complexity than KO mTEC^{hi} and other TEC populations, confirming AIRE's role in mRNA splicing. Furthermore, *Aire* deletion had no effect on the splicing complexity of mTEC^{lo} and cTEC. Then, we asked whether the pool of AIRE-independent TRA significantly contributes to the high splicing complexity observed in mTEC^{hi} (Figure 2.4E). Notably, we found that the splicing complexity of AIRE-independent TRA was superior to that of AIRE-induced TRA. Interestingly, when comparing the expression of > 400 mouse RNA-binding proteins uploaded from the database of RNA-binding specificities (RBPDB version 1.3.1)³⁹, we identified 7 genes implicated in mRNA processing and whose expression was at least 2-fold higher in mTEC^{hi} relative to mTEC^{lo} and cTEC (Figure 2.4F). Taken together, these results suggest that apart from AIRE, other mRNA processing factors expressed in mTEC^{hi} contribute to the high splicing complexity found in this cell population.

2.6.5 Tissue representation by AIRE-induced and –independent TRA

AIRE controls the expression of self-antigens representing peripheral tissues and organs¹⁰. In human, *AIRE* mutations impair clonal deletion of T cells and cause the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) syndrome⁴⁰. This syndrome exhibits pleiotropic manifestations affecting many organs^{41,42}.

To define the set of tissues represented in TEC by AIRE-induced and AIRE-independent TRA, we calculated the number of TRA specific for each tissue of the GSE10246 dataset. Furthermore, we determined the tissue enrichment ratio (odds ratio) for AIRE-induced relative to AIRE-independent TRA (Figure 2.5A). This approach allowed us to assess the level of overlap between tissues represented by the two classes of TRA. We found that tissues and organs preferentially represented by AIRE-induced TRA included typical organs affected in APECED patients (*e.g.*, pancreas, adrenal gland, stomach, liver), with the exception of the parathyroid gland, which is not included in the GSE10246 dataset. Although we detected several AIRE-independent pancreatic TRA, most pancreas-specific TRA (77%) were AIRE-induced (Figure 2.5A). These include genes encoding pancreatic digestive enzymes such as the chymotrypsin-like elastase family of proteins (*Cel3b*, *Cela1*), lipases (*Pnlip*, *Pnliprp1*, *Pla2g1b*, *Cel*), proteases (*Prss1*, *Prss2*) and regenerating islet-derived proteins (*Reg1*, *Reg2*, *Reg3b*). Other tissues preferentially represented by AIRE-induced TRA include the lactating mammary gland, bone, white adipose tissue, placenta, lacrimal gland, bone marrow, retinal epithelium, salivary gland, uterus and cornea (Figure 2.5A). Unexpectedly, we found that several tissues targeted in APECED patients (*e.g.*, epidermis, ovary and pituitary gland) were predominantly represented by AIRE-independent TRA. Thus, among ovarian genes, *Hsd3b1* (biosynthesis of hormonal steroid) was AIRE-induced whereas *Ovgp1* (oviductal epithelial glycoprotein), *Akr1c1* (progesterone metabolism) and *Inha* (gonadal hormone secretion) were AIRE-independent. Other tissues and cell populations preferentially represented by AIRE-independent TRA include macrophages, NK cells, B cells, amygdala, osteoblasts, skeletal muscle, spleen, prefrontal cerebral cortex and testes (Figure 2.5A).

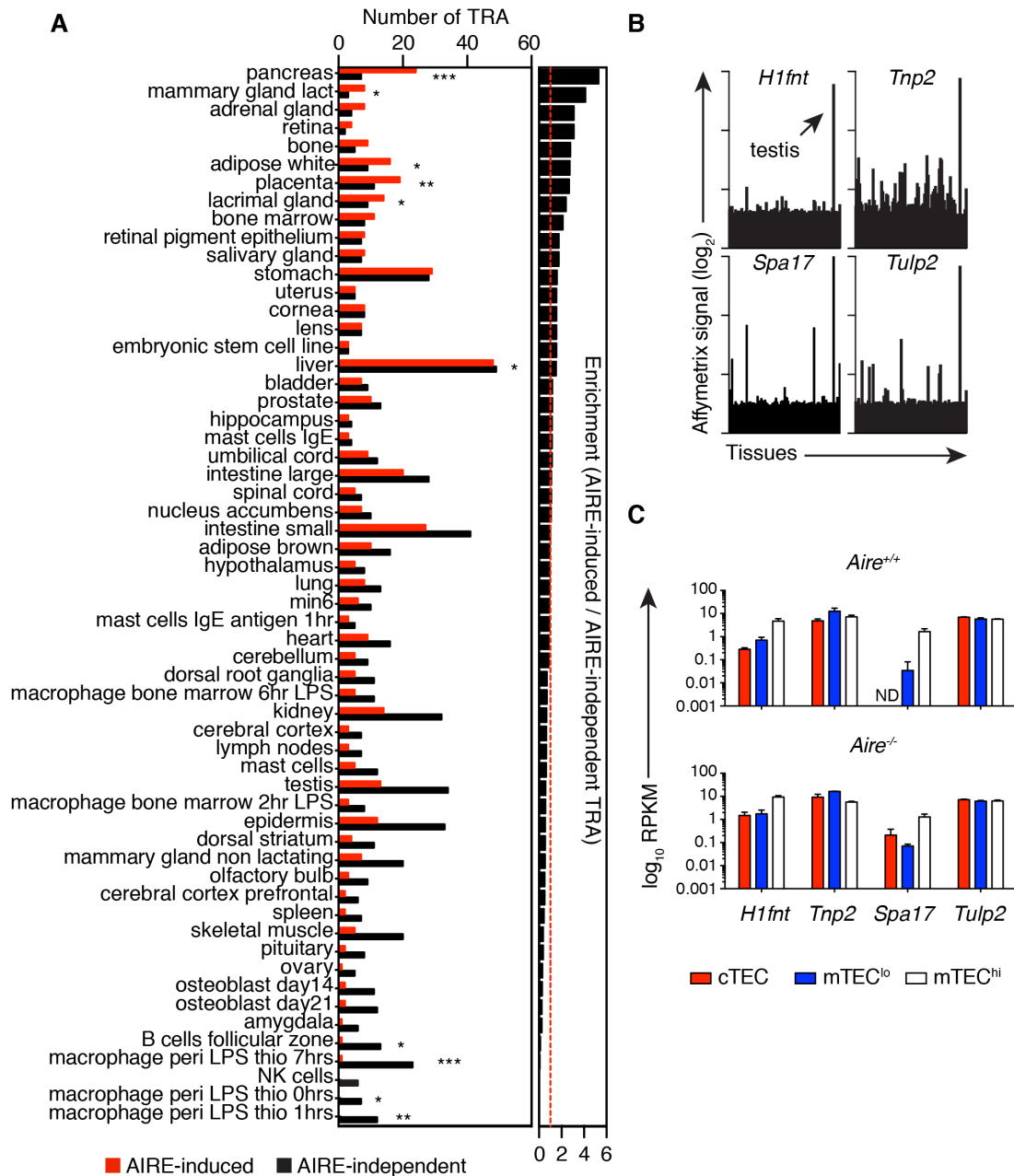


Figure 2.5 | Peripheral tissue representation of AIRE-induced and AIRE-independent TRA. (A) Histogram depicting the number of AIRE-induced (red bars) and AIRE-independent TRA (black bars) representing mouse tissues and cell lines (GSE10246 dataset). Biological samples are ordered based on their differential representation by AIRE-induced and AIRE-independent TRA. Tissues that are represented by fewer than five TRA are not displayed on the histogram. A Fisher exact test was used to assess the enrichment

in each sample. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) Expression of testis-specific AIRE-independent TRA in tissues of the GSE10246 dataset³⁶ and in (C) TEC populations from WT and Aire^{-/-} mice. Error bars indicate SD. ND, not detected.

When we combined the two types of TRA, we found that the tissues which were most represented by TRA were the liver, small and large intestine, stomach, testis, kidney, epidermis, pancreas, and placenta. Overall, we detected TRA (RPKM > 1) specific for > 50 tissues and cell types in the transcriptome of mTEC^{hi}. However, we also identified tissues and cell types with low thymic representation including hematopoietic stem cells, common myeloid progenitor, thymocytes, T cells, dendritic cells, mega-erythrocyte progenitors, granulocyte progenitors, microglia, iris and ciliary bodies (data not shown).

Evidence suggests that pGE in TEC is regulated by epigenetic mechanisms that support a hyperactive transcriptional state⁴³. This can be exemplified with AIRE's ability to bind non-methylated histone H3K4 to promote gene transcription^{44,45}. However, epigenetic regulators of AIRE-independent pGE have not been identified. The genome of embryonic stem cells (ESCs) and testicular cells undergoes major chromatin alterations during development⁴⁶. Importantly, AIRE has also been detected in ESCs and spermatocytes⁴⁷⁻⁴⁹. Interestingly, we observed that several ESC- and testis-specific TRA were expressed in mTEC^{hi} (Figure 2.5A). For example, we detected TRA involved in embryonic development (*Tdgfl*) as well as in the maintenance of ESC pluripotency (*Pou5f1*, *Dppa5a*). Testis-specific AIRE-induced TRA include a germ cell-associated gene (*Gsgl*) and spermatogenesis-associated genes (*Spata18*, *Spata19*). For AIRE-independent TRA, we found genes encoding proteins involved in sperm DNA condensation (*Tnp2*, *Tssk6*), male meiosis (*Rsph1*), sperm function and fertility (*Meig1*, *Tcp11*, *Spa17*, *Ropn11*, *Tssk3*, *Tekt2*), translation of germ cell mRNA (*Ybx2*), testis-specific H1 histone (*H1fnt*) and cancer-testis Ags (*Tub12*, *Rsph1*, *Prm1*). We speculate that these genes may be instrumental in regulating pGE in TEC. Overall, our data on TRA led us to conclude that defects in AIRE-independent pGE should cause severe autoimmune phenotypes because 1) AIRE-induced versus – independent TRA project nonredundant representations of peripheral tissues in the thymus, and 2) AIRE-independent TRA are more numerous than AIRE-induced TRA. Such autoimmune phenotype should be particularly conspicuous for organs, such as the testis, that are represented in TEC mostly by AIRE-independent TRAs. Indeed, transcripts such as *H1fnt*, *Tnp2*, *Spa17*, and *Tulp2* have a very restricted tissue distribution in extrathymic tissues where they are expressed at higher levels in the testis than in other organs (Figure 2.5B). In TEC, these testis TRA have an expression pattern that is typical of AIRE-

independent TRA (Figure 2.5C). We therefore propose that such testis TRA may represent the elusive T cell epitopes that initiate a common autoimmune disease: autoimmune orchitis. Male patients with autoimmune orchitis produce antisperm Abs, display severe sperm dysfunctions, and are infertile⁵⁰. This hypothesis might be evaluated by testing for T cell reactivity against testis TRA in subjects with autoimmune orchitis.

2.6.6 Biological processes regulated by promiscuously expressed genes

As shown in Figure 2.4A, AIRE induces the expression of > 3,000 genes. Out of these genes, 1,367 had RPKM > 1, of which only 343 (25%) were classified as TRA. Thus, the vast majority of AIRE-induced genes are not TRA. We hypothesized that this set of 1,024 non-TRA AIRE-induced genes may be instrumental in AIRE's alternative functions. By alternative functions we mean functions distinct from TRA presentation by mTEC^{hi}, such as mTEC differentiation and mTEC interactions with thymocytes and DCs¹⁵⁻¹⁷. To address this, we performed a GO term enrichment analysis on non-TRA AIRE-induced genes and we analyzed more extensively the top 10 enriched biological processes (Figure 2.6A, B). The top GO term hit for our set of input genes was “cell adhesion”. A heat map of genes implicated in the cell adhesion category (Figure 2.6C) revealed that many key regulators of cell-cell interactions were upregulated in WT mTEC^{hi}: claudins (*Cldn11*, *Cldn15*), integrins (*Itgae*, *Itgam*, *Itgb2l*, *Itgad*), selectins (*Sele*, *Selp*), and extracellular matrix-associated molecules (*Hapln3*, *Lamc3*, *Thbs4*). Their upregulation in mTEC^{hi} could drastically enhance mTEC^{hi} homotypic interactions and explain why *Aire* deletion disturbs mTEC^{hi} distribution in the thymic medulla and prevents the formation of Hassall's corpuscle-like structures^{15,51}. Likewise, differential expression of claudins, integrins, and selectins should have a significant impact on mTEC^{hi} heterotypic interactions with DCs and thymocytes^{52,53}. The presence of Vanin-1 (*Vnn1*) in this category (RPKM of ~ 5) is also noteworthy because this GPI-anchored protein regulates the migration of hematopoietic T cell precursors to the thymus⁵⁴. The downregulation of *Vnn1* in *Aire*-KO mTEC^{hi} suggests that AIRE may promote homing of T cell progenitors to the thymus.

Consistent with a previous report⁵⁵, we found the “defense response” term to be enriched in our set of AIRE-induced genes. In addition to defensins (*Defa22*, *Defb3*, 4, 19, 25, 50), we identified several molecules involved in antiviral/antibacterial (*Ifnb1*, *Stab1*) immune responses including ILs (*Il5*, *Il9*), chemokines (*Ccl1*, *Ccl20*, *Ccl28*, *Xcl1*), and antiviral enzymes (*Oas* gene family). Notably, *Xcl1* and *Ccl20* regulate DC and thymocyte migration, respectively^{56,57}. In accordance with the role of *Aire* in increasing antigenic presentation, we found that *Aire* upregulates the expression of *Tnfsf4*, which acts as a

costimulator between thymocytes and APCs and thereby enhances the development of regulatory T cells⁵⁸.

Additionally, we found in the “cell-cell signalling” category several genes that could be highly relevant to TEC biology. For instance, in line with the peculiar ability of mTEC^{hi} to transfer cytoplasmic content to neighbouring DCs¹⁷, we found that *Aire* upregulates genes implicated in synaptic exocytosis (*Cplx3*, *Sv2c*) and vesicular trafficking (*Syt4*). However, whether mTEC use strategies similar to synaptic neurons to deliver the content of secretory vesicles remains an open field of investigation. Finally, in line with the role of WNT proteins in TEC biology⁵⁹, we found that three *Wnt* genes were upregulated in WT mTEC^{hi}.

The “proteolysis” term was also enriched in our set of input genes. Of note, we observed that *Aire* induced several proteases (*Cpln8*, *9*, *13*) and carboxypeptidases (*Cpn1*, *Cpz*). These enzymes could influence not only housekeeping functions, but also MHC Ag processing, which is instrumental in induction of central tolerance, the quintessential role of mTEC^{hi} ⁵.

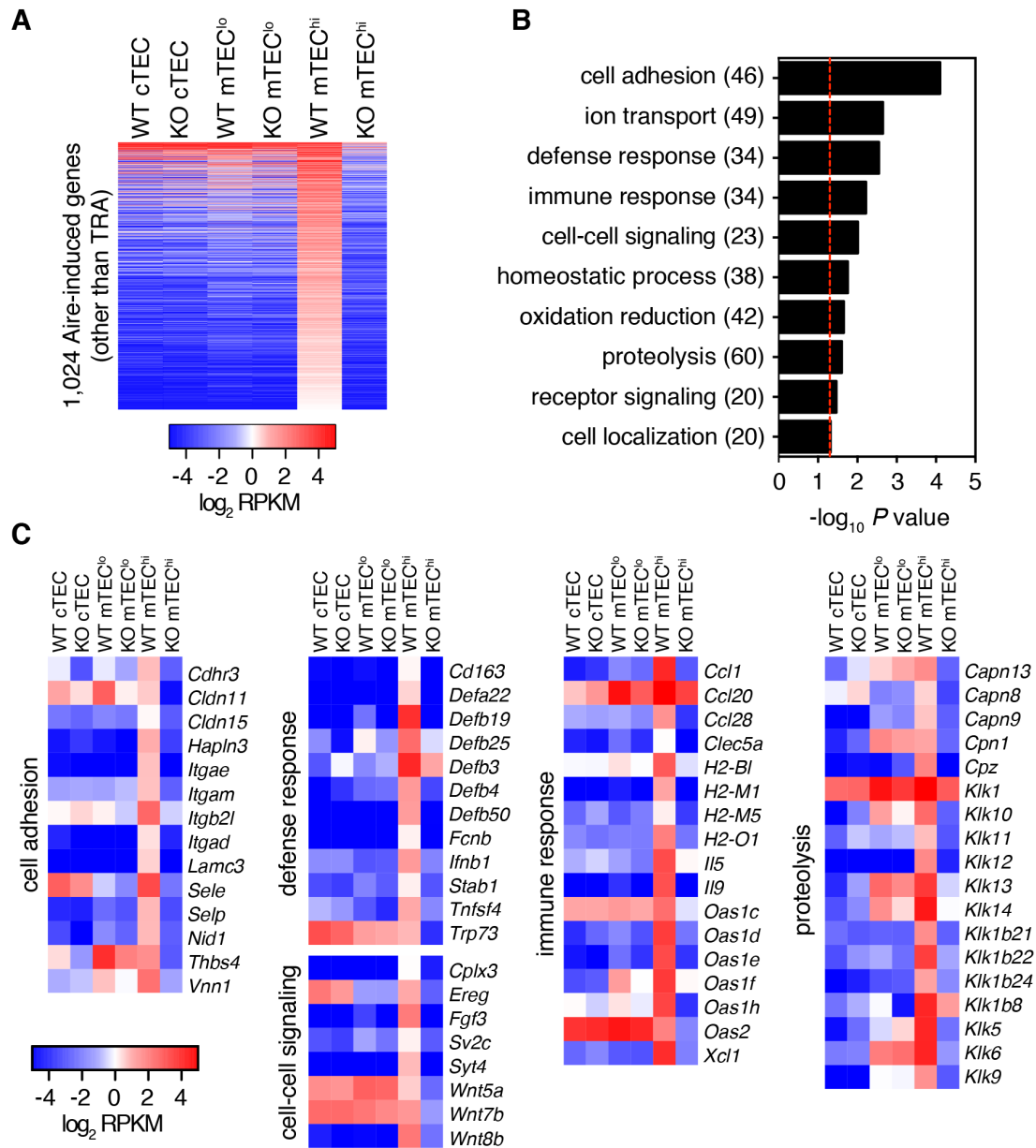


Figure 2.6 | Biological processes associated to AIRE-induced promiscuously expressed genes. (A) Expression heat map of the 1024 AIRE-induced non-TRA encoding genes (input genes) in TEC populations. (B) GO term enrichment analysis on the set of input genes. Red dashed line represents $p = 0.05$. Numbers in parentheses indicate the number of genes per category. (C) Expression heat map of genes associated to the cell adhesion, defense response, immune response, cell–cell signaling, and proteolysis terms.

2.7 Discussion

One conclusion emerging from this study is that AIRE decreases, via non-cell autonomous mechanisms, the number of cTEC by repressing positive regulators of cell differentiation and proliferation. As a parsimonious explanation for the effect of AIRE on cTEC, we surmise that it results from cell-cell signaling initiated by AIRE-regulated molecules secreted by mTEC or expressed at the surface of mTEC. Although the functional importance of this effect has yet to be demonstrated, we propose that it may contribute to the dramatic changes in TEC subsets that occur in the neonatal period: expansion of the mTEC compartment in the first weeks of life is accompanied by an abrupt decrease in the number of cTEC¹⁹. Therefore, although cTEC are the dominant TEC subset at birth, they represent only 10% of TEC in adults⁶⁰. Moreover, we confirmed that the impact of AIRE-dependent pGE is not limited to generation of TRA. In fact, our results show that 75% of AIRE-induced genes are not TRA and are associated to several biologically relevant functions in mTEC. Previous reports have shown that, irrespective of its ability to generate TRA, AIRE enhances mTEC interactions with DCs and thymocytes. In line with this, we provide mechanistic explanations for these effects. Indeed, we found that AIRE-driven pGE upregulates the expression of numerous candidate genes which play a dominant role in cell-cell interactions: claudins, integrins, selectins, the costimulator TNFSF4, as well as genes mediating synaptic exocytosis and vesicular trafficking. Importantly, gain- and loss-of-function-based experiments will be required to 1) tie gene expression to biological functions and to 2) evaluate the role of these molecules in homotypic and heterotypic interactions involving mTEC^{hi} and their role in induction of central tolerance. The upregulation of proteases and peptidases by AIRE is also of prime interest. Indeed, the massive pGE observed in mTEC^{hi} must represent a challenge for proteostasis in these cells. Assuming that promiscuously expressed genes are translated, mTEC^{hi} must have to deal with high intracellular protein levels which would normally trigger proteotoxic stress response and proliferative exhaustion⁶¹. There are only two ways to deal with this problem: by decreasing translation or increasing protein degradation. We therefore speculate that upregulation of proteases and peptidases may have an important role in alleviating proteotoxic stress in mTEC^{hi}.

pGE in TEC is essential in order to prevent autoimmunity. Although the fascinating mechanistic underpinnings of AIRE-dependent pGE are rather well understood, AIRE-independent pGE remains an enigma. Our report shows that AIRE-induced and -independent TRA present several distinctive features. First, we confirmed that AIRE-induced TRA are found exclusively in mTEC^{hi} whereas AIRE-independent TRA are detected not only in mTEC^{hi} but also in cTEC and mTEC^{lo}⁹. Additionally, we show that relative to AIRE-induced TRA, AIRE-independent TRA 1) are more numerous and 2) show greater splicing complexity. Our observations on splicing complexity suggest that mRNA splicing factors overexpressed in mTEC^{hi} regulate the processing of AIRE-independent TRA for the generation of tissue-specific isoforms. We propose that particular attention should be paid to *Snrpn*, a modulator of alternative splicing⁶² whose expression was 5-fold higher in mTEC^{hi} than in other TEC populations (GSE65617). Additionally, we observed that some tissues are represented in TEC mostly by AIRE-induced TRA whereas others are represented mainly by AIRE-independent TRA. Taken together, these data mean that AIRE-induced vs. -independent pGE are not functionally redundant and that impairment of AIRE-independent pGE should lead to autoimmunity. Arguably the most perplexing question in this field is the identity of gene(s) responsible for AIRE-independent pGE. In this regard, it is notable that AIRE-independent TRA were strikingly enriched in ovary- and testis-specific genes (Figure 2.5A). This could be a meaningful clue as to the identity of AIRE-independent pGE regulators, because transcriptional regulation in germ cells is different from that in typical somatic cells. Germ cells have a unique chromatin reorganization program and use distinct promoter elements and transcription factors⁶³. We therefore hypothesize that germ cell-specific transcriptional regulators that are promiscuously expressed in TEC may be responsible for AIRE-independent pGE.

2.8 Acknowledgments

We are grateful to Danièle Gagné and Gaël Dulude (flow cytometry and cell sorting), Marianne Arteau (RNA-sequencing experiment) and Patrick Gendron (bioinformatics) for their help and sound advice. The authors also thank the personnel of IRIC animal care facility.

2.9 Disclosures

The authors declare no competing financial interests.

2.10 References

1. Blais, M.-E., S. Brochu, M. Giroux, M.-P. Bélanger, G. Dulude, R.-P. Sékaly, and C. Perreault. 2008. Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different. *J. Immunol.* 180: 2299–2312.
2. Boehm, T., I. Hess, and J. B. Swann. 2012. Evolution of lymphoid tissues. *Trends Immunol.* 33: 315–321.
3. Suen, A. Y. W., and T. A. Baldwin. 2012. Proapoptotic protein Bim is differentially required during thymic clonal deletion to ubiquitous versus tissue-restricted antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 893–898.
4. Cowan, J. E., S. M. Parnell, K. Nakamura, J. H. Caamano, P. J. Lane, E. J. Jenkinson, W. E. Jenkinson, and G. Anderson. 2013. The thymic medulla is required for Foxp3+ regulatory but not conventional CD4+ thymocyte development. *J. Exp. Med.* 210: 675–681.
5. Klein, L., B. Kyewski, P. M. Allen, and K. A. Hogquist. 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* 14: 377–391.
6. Miller, F. W., L. Alfredsson, K. H. Costenbader, D. L. Kamen, L. M. Nelson, J. M. Norris, and A. J. De Roos. 2012. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: Findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J. Autoimmun.* 39: 259–271.
7. Klein, L., M. Hinterberger, G. Wirnsberger, and B. Kyewski. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 833–844.
8. St-Pierre, C., S. Brochu, J. R. Vanegas, M. Dumont-Lagacé, S. Lemieux, and C. Perreault. 2013. Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci. Rep.* 3: 1860.

9. Sansom, S. N., N. Shikama-Dorn, S. Zhanybekova, G. Nusspaumer, I. C. Macaulay, M. E. Deadman, A. Heger, C. P. Ponting, and G. A. Holländer. 2014. Population and single cell genomics reveal the Aire-dependency, relief from polycomb silencing and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Res.* 24: 1918–1931.
10. Liston, A., S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen, and C. C. Goodnow. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat. Immunol.* 4: 350–354.
11. Mathis, D., and C. Benoist. 2009. Aire. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 287–312.
12. Danso-Abeam, D., K. A. Staats, D. Franckaert, L. Van Den Bosch, A. Liston, D. H. Gray, and J. Dooley. 2013. Aire mediates thymic expression and tolerance of pancreatic antigens via an unconventional transcriptional mechanism. *Eur. J. Immunol.* 43: 75–84.
13. Waterfield, M., I. S. Khan, J. T. Cortez, U. Fan, T. Metzger, A. Greer, K. Fasano, M. Martinez-Llordella, J. L. Pollack, D. J. Erle, M. Su, and M. S. Anderson. 2014. The transcriptional regulator Aire coopts the repressive ATF7ip-MBD1 complex for the induction of immunotolerance. *Nat. Immunol.* 15: 258–265.
14. Giraud, M., H. Yoshida, J. Abramson, P. B. Rahl, R. A. Young, D. Mathis, and C. Benoist. 2012. Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 535–540.
15. Yano, M., N. Kuroda, H. Han, M. Meguro-Horike, Y. Nishikawa, H. Kiyonari, K. Maemura, Y. Yanagawa, K. Obata, S. Takahashi, T. Ikawa, R. Satoh, H. Kawamoto, Y. Mouri, and M. Matsumoto. 2008. Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J. Exp. Med.* 205: 2827–2838.
16. Anderson, M. S., E. S. Venzani, Z. Chen, S. P. Berzins, C. Benoist, and D. Mathis. 2005. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 23: 227–239.

17. Hubert, F.-X., S. A. Kinkel, G. M. Davey, B. Phipson, S. N. Mueller, A. Liston, A. I. Proietto, P. Z. F. Cannon, S. Forehan, G. K. Smyth, L. Wu, C. C. Goodnow, F. R. Carbone, H. S. Scott, and W. R. Heath. 2011. Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* 118: 2462–2472.
18. Derbinski, J., J. Gäbler, B. Brors, S. Tierling, S. Jonnakuty, M. Hergenhausen, L. Peltonen, J. Walter, and B. Kyewski. 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* 202: 33–45.
19. Gray, D. H., N. Seach, T. Ueno, M. K. Milton, A. Liston, A. M. Lew, C. C. Goodnow, and R. L. Boyd. 2006. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* 108: 3777–3785.
20. Wong, K., N. L. Lister, M. Barsanti, J. M. Lim, M. V Hammett, D. M. Khong, C. Siatskas, D. H. Gray, R. L. Boyd, and A. P. Chidgey. 2014. Multilineage potential and self-renewal define an epithelial progenitor cell population in the adult thymus. *Cell Rep.* 8: 1198–1209.
21. Anders, S., D. J. McCarthy, Y. Chen, M. Okoniewski, G. K. Smyth, W. Huber, and M. D. Robinson. 2013. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat. Protoc.* 8: 1765–1786.
22. Anders, S., and W. Huber. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11: R106.
23. Mortazavi, A., B. A. Williams, K. McCue, L. Schaeffer, and B. Wold. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5: 621–628.
24. Huang, D. W., B. T. Sherman, and R. A. Lempicki. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4: 44–57.
25. Huang, D. W., B. T. Sherman, and R. A. Lempicki. 2009. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic*

26. Hubert, F.-X., S. A. Kinkel, K. E. Webster, P. Cannon, P. E. Crewther, A. I. Proietto, L. Wu, W. R. Heath, and H. S. Scott. 2008. A specific anti-Aire antibody reveals aire expression is restricted to medullary thymic epithelial cells and not expressed in periphery. *J. Immunol.* 180: 3824–3832.
27. Cabral, A., P. Voskamp, A. M. Cleton-Jansen, A. South, D. Nizetic, and C. Backendorf. 2001. Structural organization and regulation of the small proline-rich family of cornified envelope precursors suggest a role in adaptive barrier function. *J. Biol. Chem.* 276: 19231–19237.
28. Vanhoutteghem, A., P. Djian, and H. Green. 2008. Ancient origin of the gene encoding involucrin, a precursor of the cross-linked envelope of epidermis and related epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 15481–15486.
29. Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 328–340.
30. Dudakov, J. A., A. M. Hanash, R. R. Jenq, L. F. Young, A. Ghosh, N. V. Singer, M. L. West, O. M. Smith, A. M. Holland, J. J. Tsai, R. L. Boyd, and M. R. M. van den Brink. 2012. Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* 336: 91–95.
31. Jenkinson, W. E., E. J. Jenkinson, and G. Anderson. 2003. Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *J. Exp. Med.* 198: 325–332.
32. Villaseñor, J., W. Besse, C. Benoist, and D. Mathis. 2008. Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 15854–15859.
33. Derbinski, J., S. Pinto, S. Rösch, K. Hexel, and B. Kyewski. 2008. Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 657–662.

34. Metzger, T. C., I. S. Khan, J. M. Gardner, M. L. Mouchess, K. P. Johannes, A. K. Krawisz, K. M. Skrzypczynska, and M. S. Anderson. 2013. Lineage tracing and cell ablation identify a post-aire-expressing thymic epithelial cell population. *Cell Rep.* 5: 166–179.
35. Pinto, S., C. Michel, H. Schmidt-Glenewinkel, N. Harder, K. Rohr, S. Wild, B. Brors, and B. Kyewski. 2013. Overlapping gene coexpression patterns in human medullary thymic epithelial cells generate self-antigen diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: E3497-3505.
36. Lattin, J. E., K. Schroder, A. I. Su, J. R. Walker, J. Zhang, T. Wiltshire, K. Saijo, C. K. Glass, D. A. Hume, S. Kellie, and M. J. Sweet. 2008. Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages. *Immunome Res.* 4: 1–13.
37. Abramson, J., M. Giraud, C. Benoist, and D. Mathis. 2010. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* 140: 123–135.
38. Keane, P., R. Ceredig, and C. Seoighe. 2014. Promiscuous mRNA splicing under the control of AIRE in medullary thymic epithelial cells. *Bioinformatics* 31: 986-990.
39. Cook, K. B., H. Kazan, K. Zuberi, Q. Morris, and T. R. Hughes. 2011. RBPDB: A database of RNA-binding specificities. *Nucleic Acids Res.* 39: 1–8.
40. Akirav, E. M., N. H. Ruddle, and K. C. Herold. 2011. The role of AIRE in human autoimmune disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7: 25–33.
41. Villaseñor, J., C. Benoist, and D. Mathis. 2005. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 204: 156–164.
42. De Martino, L., D. Capalbo, N. Improda, F. D'Elia, R. Di Mase, R. D'Assante, I. D'Acunzo, C. Pignata, and M. Salerno. 2013. APECED: a paradigm of complex interactions between genetic background and susceptibility factors. *Front. Immunol.* 4: 331.
43. Tykocinski, L., A. Sinemus, E. Rezavandy, Y. Weiland, D. Baddeley, and C. Cremer.

2010. Epigenetic regulation of promiscuous gene expression in thymic medullary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 19426-19431.
44. Org, T., F. Chignola, C. Hetényi, M. Gaetani, A. Rebane, I. Liiv, U. Maran, L. Mollica, M. J. Bottomley, G. Musco, and P. Peterson. 2008. The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep.* 9: 370–376.
 45. Koh, A. S., A. J. Kuo, S. Y. Park, P. Cheung, J. Abramson, D. Bua, D. Carney, S. E. Shoelson, O. Gozani, R. E. Kingston, C. Benoist, and D. Mathis. 2008. Aire employs a histone-binding module to mediate immunological tolerance, linking chromatin regulation with organ-specific autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 15878–15883.
 46. Reik, W. 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447: 425–432.
 47. Nishikawa, Y., F. Hirota, M. Yano, H. Kitajima, J. Miyazaki, H. Kawamoto, Y. Mouri, and M. Matsumoto. 2010. Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells before end-stage terminal differentiation. *J. Exp. Med.* 207: 963–971.
 48. Gu, B., J. Zhang, Q. Chen, B. Tao, W. Wang, Y. Zhou, L. Chen, Y. Liu, and M. Zhang. 2010. Aire regulates the expression of differentiation-associated genes and self-renewal of embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394: 418–423.
 49. Schaller, C. E., C. L. Wang, G. Beck-Engeser, L. Goss, H. S. Scott, M. S. Anderson, and M. Wabl. 2008. Expression of Aire and the early wave of apoptosis in spermatogenesis. *J. Immunol.* 180: 1338–1343.
 50. Silva, C. A., M. Cocuzza, J. F. Carvalho, and E. Bonfá. 2014. Diagnosis and classification of autoimmune orchitis. *Autoimmun. Rev.* 13: 431–434.
 51. Dooley, J., M. Erickson, and A. G. Farr. 2008. Alterations of the medullary epithelial

- compartment in the Aire-deficient thymus: implications for programs of thymic epithelial differentiation. *J. Immunol.* 181: 5225–5232.
52. Heiskala, M., P. A. Peterson, and Y. Yang. 2001. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic* 2: 93–98.
 53. Love, P. E., and A. Bhandoola. 2011. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 469–477.
 54. Aurrand-Lions, M., F. Galland, H. Bazin, V. M. Zakharyev, B. A. Imhof, and P. Naquet. 1996. Vanin-1, a novel GPI-linked perivascular molecule involved in thymus homing. *Immunity* 5: 391–405.
 55. Ki, S., D. Park, H. J. Selden, J. Seita, H. Chung, J. Kim, V. R. Iyer, and L. I. R. Ehrlich. 2014. Global transcriptional profiling reveals distinct functions of thymic stromal subsets and age-related changes during thymic involution. *Cell Rep.* 9: 402–415.
 56. Bunting, M. D., I. Comerford, E. E. Kara, H. Korner, and S. R. Mccoll. 2014. CCR6 supports migration and differentiation of a subset of DN1 early thymocyte progenitors but is not required for thymic nTreg development. *Immunol. Cell Biol.* 92: 489–498.
 57. Lei, Y., A. M. Ripen, N. Ishimaru, I. Ohigashi, T. Nagasawa, L. T. Jeker, M. R. Bösl, G. A. Holländer, Y. Hayashi, R. D. W. Malefyt, T. Nitta, and Y. Takahama. 2011. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* 208: 383–394.
 58. Mahmud, S. A., L. S. Manlove, H. M. Schmitz, Y. Xing, Y. Wang, D. L. Owen, J. M. Schenkel, J. S. Boomer, J. M. Green, H. Yagita, H. Chi, K. a Hogquist, and M. a Farrar. 2014. Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 15: 473–481.

59. Heinonen, K. M., J. R. Vanegas, S. Brochu, J. Shan, S. J. Vainio, and C. Perreault. 2011. Wnt4 regulates thymic cellularity through the expansion of thymic epithelial cells and early thymic progenitors. *Blood* 118: 5163–5173.
60. Dumont-Lagacé, M., S. Brochu, C. St-Pierre, and C. Perreault. 2014. Adult thymic epithelium contains nonsenescent label-retaining cells. *J. Immunol.* 192: 2219–2226.
61. Buszczak, M., R. A. Signer, and S. J. Morrison. 2014. Cellular differences in protein synthesis regulate tissue homeostasis. *Cell* 159: 242–251.
62. Lee, M., Y. Lin, Y. Deng, W. Hsu, and C. Shen. 2014. Modulation of alternative splicing by expression of small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N. *FEBS J.* 281: 5194–5207.
63. Sassone-Corsi, P. 2002. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296: 2176–2178.

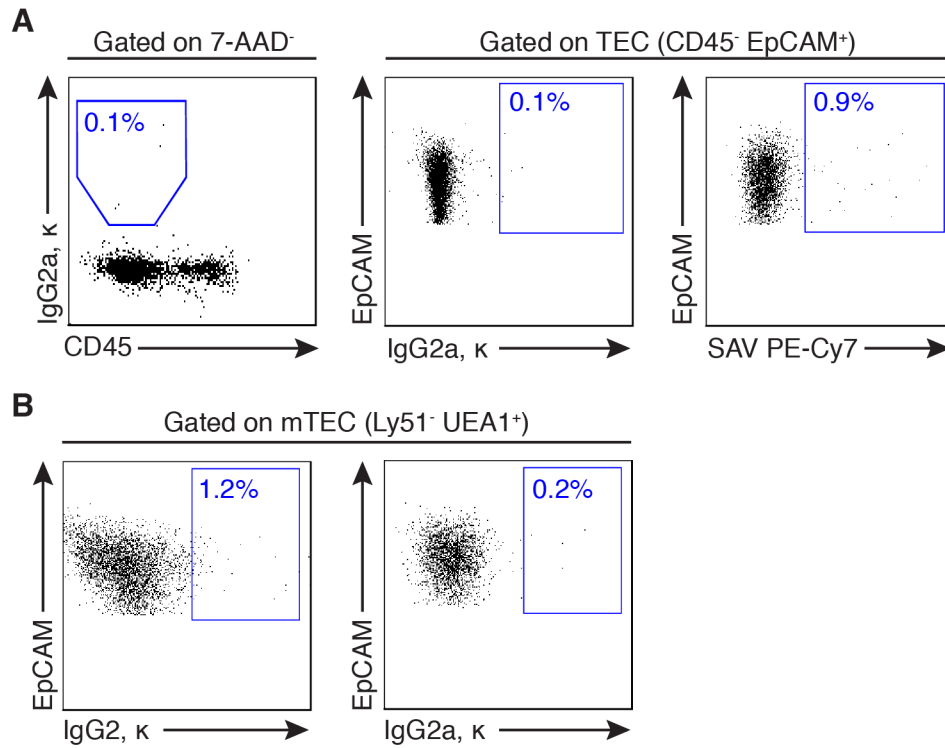
2.11 Footnotes

¹This work was supported by grant MOP 42384 from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). C.S.P is supported by a doctoral scholarship from Le Fonds de recherche du Québec–Santé and C.P. holds a Canada Research Chair in Immunobiology. The Institute for Research in Immunology and Cancer is supported in part by the Canada Foundation for Innovation and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

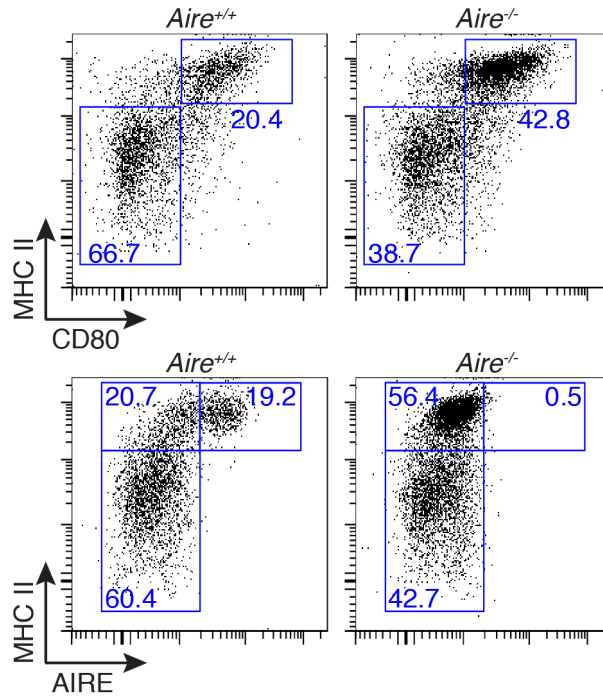
²Address correspondence and reprint requests to Pr. Claude Perreault (claude.perreault@umontreal.ca), Institute for Research in Immunology and Cancer, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7. Phone: 514-343-6126; Fax: 514-343-5839.

³Abbreviations used in this paper: DEG, differentially expressed gene; ESC, embryonic stem cell; TEC, thymic epithelial cells; cTEC and mTEC, cortical and medullary TEC; mTEC^{lo} and mTEC^{hi}; immature and mature mTEC; pGE, promiscuous gene expression; TRA, tissue-restricted antigens; RNA-seq, RNA-sequencing; WT, wild-type; 7-AAD, 7-aminoactinomycin D.

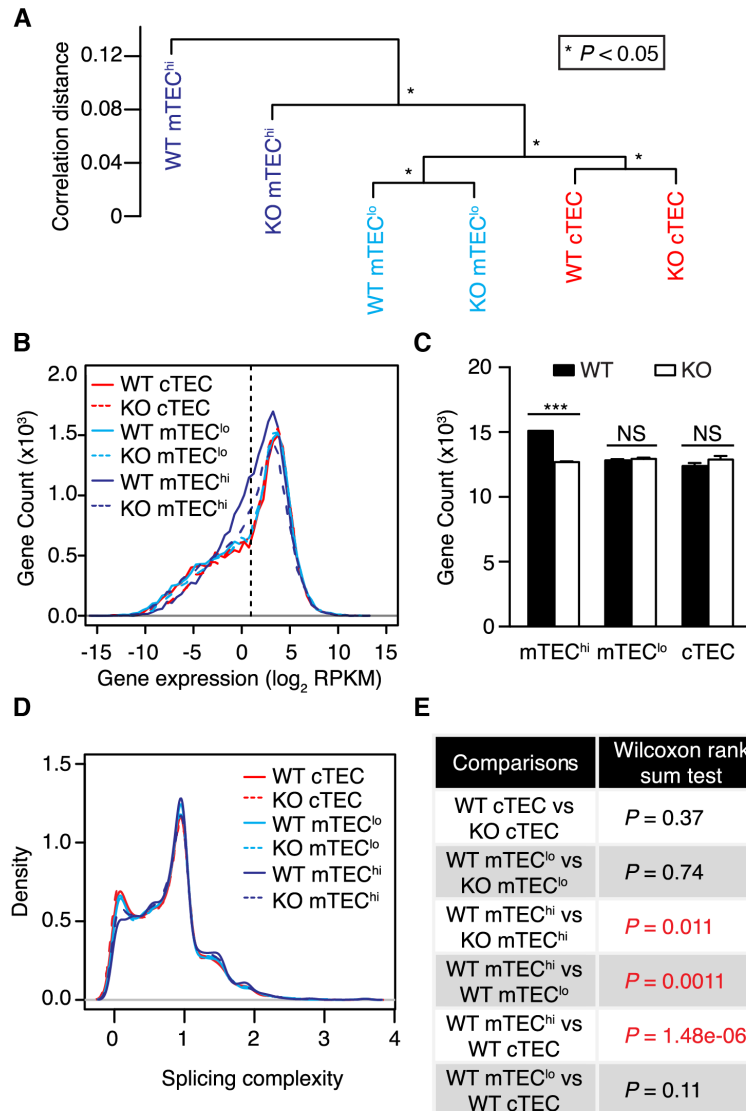
2.12 Supplemental Data



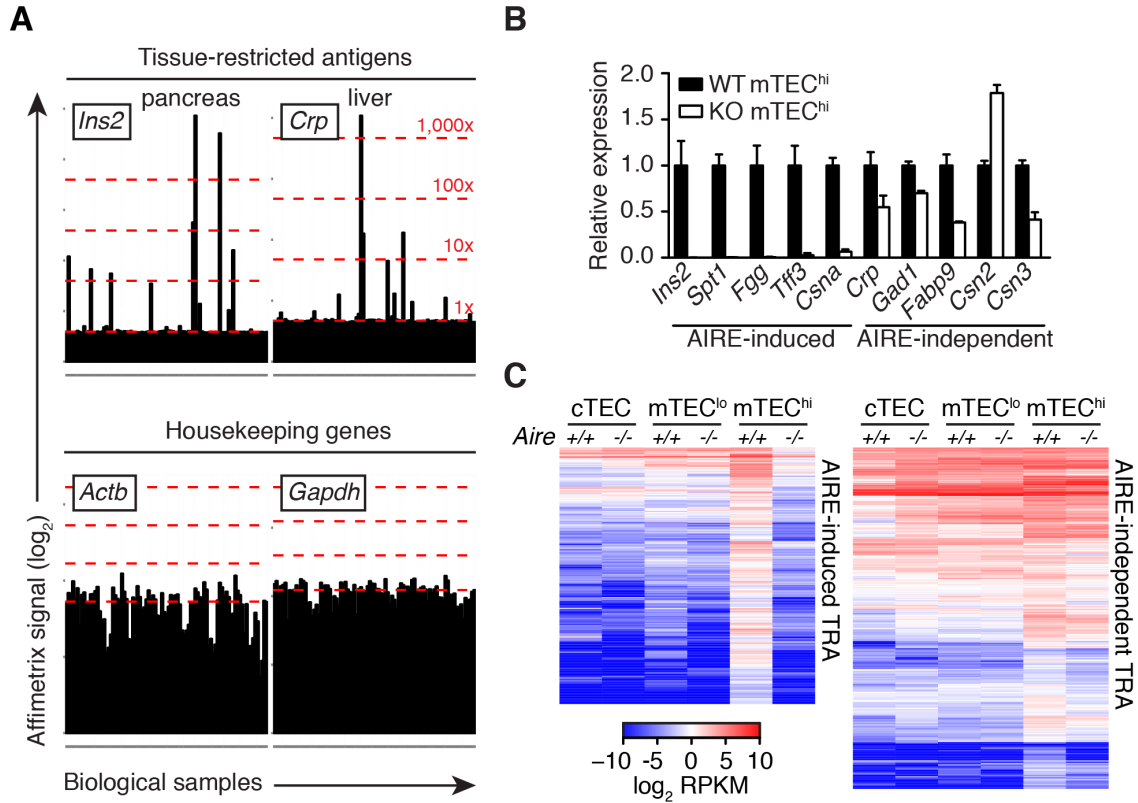
Supplemental Figure 2.S1 | Isotype controls for flow cytometry analysis. (A) Isotype controls for EpCAM and Ly51 antibodies and negative control for UEA1 staining (streptavidin only) on TEC from 6-8 week-old mice. (B) Isotype controls for CD80 and MHC II labeling on mTEC.



Supplemental Figure 2.S2 | Flow cytometry analysis of TEC in WT and *Aire*-deficient mice. Representative flow cytometry profiles of mTEC^{lo} (CD80^{lo} MHC II^{lo}) and mTEC^{hi} (CD80^{hi} MHC II^{hi}) in WT and *Aire*-KO mice and expression of AIRE in gated mTEC (UEA1⁺ Ly51⁻).



Supplemental Figure 2.S3 | Bioinformatics analyses on the transcriptome of TEC populations. (A) Hierarchical clustering of gene expression levels in WT and KO TEC populations by correlation distance. Stars indicate significant clusters measured by a multi-scale bootstrap resampling method. (B) Linear histogram of gene expression (\log_2 RPKM) in WT and KO TEC populations. Genes with RPKM > 1 were considered as being expressed (vertical dashed line). Non-detected genes are not displayed on the representation. (C) Number of expressed genes in TEC populations from WT and KO mice. (D) Splicing complexity of multi-isoform genes detected in all TEC populations. (E) Differences in splicing complexity were measured by the Wilcoxon rank sum test.



Supplemental Figure 2.S4 | Identification of tissue-restricted antigens. (A) Tissue expression profile of two TRAs (e.g. *Ins2*, *Crp*) identified using the GSE10246 dataset and 2 housekeeping genes (e.g. *Actb*, *Gapdh*). Data are represented as histogram of gene expression (\log_2 Affymetrix signal) for the 91 tissues and cell lines found in the GSE10246 dataset. Horizontal red dashed lines represent the different thresholds of tissue specificity that can be used to identify TRA. Each line is a multiple (x) of the median gene expression across all biological samples. (B) Data depict transcript abundance relative to WT mTEC^{hi} for known AIRE-induced and AIRE-independent TRA. (C) Gene expression heatmap of AIRE-induced and AIRE-independent TRAs identified with RNA-seq.

CHAPITRE 3

3. Immunoproteasomes control the homeostasis of medullary thymic epithelial cells by alleviating proteotoxic stress

Charles St-Pierre^{1,2}, Erwan Morgand^{1,3}, Mohamed Benhammadi^{1,2}, Alexandre Rouette^{1,2},
Marie-Pierre Hardy¹, Louis Gaboury^{1,4}, Claude Perreault^{1,2,5,*}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7.

²Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7.

³ENS Paris-Saclay, Université Paris-Saclay, Cachan 94230, France.

⁴Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada H3T 1J4.

⁵Lead contact

*Correspondence: claudio.perreault@umontreal.ca

Cell Reports, Volume 21, pages 2558-2570, November 28th, 2017

3.1 Présentation de l'article #2

Le rôle premier de la médulla thymique est d'induire la tolérance au soi immunitaire. Ce processus est rendu possible grâce à l'EGP, une propriété unique qui permet de contrôler l'expression génique à large échelle, notamment chez les mTEC^{hi}. Avant d'initier ce deuxième projet de recherche, l'EGP avait seulement été étudié au niveau transcriptionnel. Or, pour que les gènes exprimés de façon promiscuitaire dans les mTEC^{hi} induisent la tolérance au soi, ces gènes doivent obligatoirement être traduits en protéines. En considérant l'impact majeur de l'EGP sur le transcriptome des mTEC^{hi} (Chapitre 2), nous avons raisonné que la traduction d'autant de protéines devait représenter un défi majeur pour la régulation de l'homéostasie des protéines chez les mTEC^{hi}.

L'homéostasie des protéines (protéostasie) représente l'ensemble des processus cellulaires impliqués dans le maintien de l'équilibre entre la production de protéines et leur élimination. Or, un débalancement chronique de cet équilibre, mène au stress protéotoxique, une caractéristique typique du vieillissement cellulaire qui mène inévitablement à une perte d'intégrité fonctionnelle au niveau cellulaire et à une diminution du potentiel régénératif. Nous avons donc décidé d'étudier la régulation de la protéostasie chez les mTECs dans le contexte de la dégénérescence prématurée que subit le thymus avec l'âge.

Nous avons émis l'hypothèse que l'EGP représente un défi majeur pour la régulation de la protéostasie chez les mTEC^{hi} et que ces cellules possèdent une capacité supérieure à maintenir la protéostasie. Dans cette étude, nous avons cherché à évaluer l'effet de l'EGP au niveau protéomique (notamment au niveau de la synthèse protéique) et à identifier des régulateurs de la protéostasie chez les mTECs.

Nous avons utilisé une grande variété d'approches expérimentales pour étudier les mTECs in vitro et in vivo : cytométrie en flux, marquage in vivo à la puromycine (pour évaluer les taux de synthèse protéique), analyses transcriptomiques, transplantation de thymus et de cellules de moelle osseuse, essai de régénération in vivo, culture ex vivo de thymus fœtaux et essais de formation de colonies in vitro.

Bien que l'EGP permette aux mTEC^{hi} d'établir la tolérance au soi, nos résultats supportent un nouveau paradigme selon lequel le prix à payer pour l'EGP est une augmentation des taux de synthèse protéique et de la susceptibilité au stress protéotoxique dans les mTEC^{hi}, qui ont besoin de l'immunoprotéasome (IP) pour atténuer ce stress. Le dogme actuel maintient que le rôle prédominant de l'IP dans les mTECs est de générer des peptides pour la tolérance au soi immunitaire. Cependant, nos travaux identifient l'IP comme un régulateur majeur de l'homéostasie des mTECs et fournissent une explication pour l'expression constitutive de l'IP dans les mTECs. Notamment, nous avons trouvé que la perte de l'IP cause un épuisement rapide des cellules souches de mTECs et que les souris dépourvues d'IP présentent une involution thymique accélérée et un syndrome auto-immun affectant plusieurs organes.

3.2 Contributions des auteurs

CSP: Conception du design expérimental, planification et exécution des expériences, analyse et discussion des résultats, préparation de toutes les figures (Figures 3.1 à 3.6 et Supplemental Figures 3.S1 à 3.S6) et écriture du manuscrit

EM: Exécution et analyse d'expériences (Figure 3.6D, E) et révision du manuscrit

MB: Exécution et analyse d'expérience (Figure 3.1E) et révision du manuscrit

AR: Exécution d'expériences (Supplemental Figure 3.3B) et révision du manuscrit

MPH: Exécution d'expériences (Figure 3.2G) et révision du manuscrit

LG: Analyse des résultats (Figure 3.3A, G), discussion générale et révision du manuscrit

CP: Planification, analyse des résultats, discussion générale et écriture du manuscrit

3.3 Summary

The sole nonredundant role of the thymic medulla is to induce central tolerance, a vital process that depends on promiscuous gene expression (pGE), a unique feature of medullary thymic epithelial cells (mTECs). Although pGE enhances transcription of >3,000 genes in mTECs, its impact on the regulation of protein homeostasis remains unexplored. Here, we report that, because of pGE, mature mTECs synthesize substantially more proteins than other cell types, and are exquisitely sensitive to loss of immunoproteasomes (IPs). Indeed, IP deficiency causes proteotoxic stress in mTECs and leads to exhaustion of postnatal mTEC progenitors. Moreover, IP-deficient mice show accelerated thymic involution, which is characterized by a selective loss of mTECs and multiorgan autoimmune manifestations. We conclude that pGE, the quintessential feature of mTECs, is a major burden for the maintenance of proteostasis, which is alleviated by the constitutive expression of IPs in mTECs.

Keywords

Thymic epithelial cells, thymic involution, self-tolerance, promiscuous gene expression, immunoproteasomes, proteotoxic stress, autoimmunity

3.4 Highlights

- Mature mTECs synthesize more proteins than other cell types
- IPs alleviate proteotoxic stress in mTECs
- IP deficiency leads to exhaustion of adult mTEC progenitors
- IP deficiency causes thymic atrophy and autoimmunity

3.5 eTOC Blurbs

Immunoproteasomes (IPs) are constitutively expressed in medullary thymic epithelial cells (mTECs) but their precise function remains elusive. St-Pierre et al. find a role for IPs in the mitigation of proteotoxic stress and maintenance of the mTEC compartment in adult mice.

3.6 Introduction

In all vertebrates, the thymus is the sole site where hematopoietic progenitors develop into functionally competent classic T cells (Boehm et al., 2012). T cells generated extrathymically are autoreactive, functionally deficient and cannot substitute for classic thymic T cells (Blais et al., 2006). Notably, the thymus ages more rapidly than other tissues and organs because of a progressive loss of thymic epithelial cells (TECs), which is particularly drastic in the case of medullary TECs (mTECs) (Dumont-Lagacé et al., 2014; Gray et al., 2006). Thymic involution increases the susceptibility to infection and infectious diseases, and impairs response to vaccines and cancer immunosurveillance (Dooley and Liston, 2012; Ventevogel and Sempowski, 2013). A better understanding of mechanisms controlling mTEC homeostasis would greatly facilitate the rational design of novel strategies for reversing age-associated thymic involution.

While cortical TECs (cTECs) are essential for the early events of T cell differentiation, the primary role of mTECs is in the establishment of self-tolerance through negative selection and generation of regulatory T cells (Klein et al., 2014). The distinctive feature of mTECs is their ability to express almost the entire repertoire of known protein-coding genes through so-called promiscuous gene expression (pGE) (Samsom et al., 2014; St-Pierre et al., 2015). pGE is driven by Aire and Fezf2 transcription factors which induce the expression of >3,000 genes (Anderson et al., 2002; Takaba et al., 2015). To date, studies on pGE have been limited to the transcriptional level. However, for promiscuously expressed transcripts to induce tolerance, these transcripts must be translated. Considering the broad impact of pGE on the transcriptome, we reasoned that translation of so many proteins should represent a major challenge for protein homeostasis (i. e. proteostasis) in mTECs. Chronic proteotoxic stress, a hallmark of aging, inevitably leads to loss of functional cell integrity and regenerative capacity (Kaushik and Cuervo, 2015). We therefore surmised that mTECs may have a superior ability to deal with proteotoxic stress. In cells poised to synthesize large amounts of proteins, one strategy that can maintain proteostasis is to increase the protein degradation rate. We therefore investigated a peculiar feature of mTECs: in addition to constitutive proteasomes (CPs) they constitutively express immunoproteasomes (IPs) (Nil et al., 2004). In contrast, cTECs contain thymoproteasomes,

characterized by a relatively low chymotryptic activity (Murata et al., 2007), whereas other epithelial cell types constitutively express only CPs (St-Pierre et al., 2013). CPs and IPs have different catalytic subunits (PSMB5, 6 and 7 in CPs and PSMB8, 9 and 10 in IPs) (Basler et al., 2013). Relative to CPs, IPs have distinct protein cleavage preferences (de Verteuil et al., 2010), greater proteolytic activity (Liepe et al., 2015) and greater ability to alleviate proteotoxic stress (Yun et al., 2016).

The goal of our work was therefore to determine whether pGE affects protein synthesis and whether IPs play nonredundant roles in mTECs. Herein, we report that as a consequence of pGE, mature mTECs synthesize substantially more proteins than other cell types and are exquisitely sensitive to loss of IP activity. Furthermore, mice in which IPs are replaced by CPs show accelerated thymic involution, perturbed mTEC homeostasis, and autoimmunity.

3.7 Results

3.7.1 Mature mTECs synthesize more proteins than other cell types

To assess the impact of pGE at the proteomic level, we used *in vivo* puromycin (Puro) incorporation to evaluate global protein synthesis in individual thymic cells. Since Puro is an analog of ribosomal aminoacyl-transfer RNA, it is incorporated into nascent polypeptide chains and can be quantitated by flow cytometry (fluorescence-activated cell sorting [FACS]) (Schmidt et al., 2009). We administered Puro to 6- to 8-week old C57BL/6 (wild-type [WT]) mice, which were euthanized 1 hr later to analyze Puro incorporation in various thymic cell populations (Supplemental Figure 3.S1A, B). Of note, the size of thymic cell populations in Puro-injected mice was similar to that of PBS-injected control mice (Supplemental Figure 3.S1C). Puro incorporation was readily detectable in thymocytes 1 hr after administration (Figure 3.1A, left). Moreover, Puro incorporation was translation-dependent since it decreased by 97% upon *in vitro* treatment of thymocytes with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (Figure 3.1A, right). mTECs can be subdivided into major histocompatibility complex (MHC) class II (MHCII) low (mTEC^{lo}) and MHC class II high (mTEC^{hi}) subsets. Most pGE occurs in the more differentiated mTEC^{hi} subset. Relative to thymocytes, the rate of protein synthesis was increased by 1.6- and 2.5-fold in mTEC^{lo} and mTEC^{hi}, respectively (Figure 3.1B). Likewise, mTEC^{hi} unequivocally displayed the highest translational activity of all thymic cell populations when the rates of protein synthesis were normalized according to cellular size (Supplemental Figure 3.S2A, B). The salient finding is therefore that the degree of pGE correlates with the rate of protein synthesis in mTEC subsets.

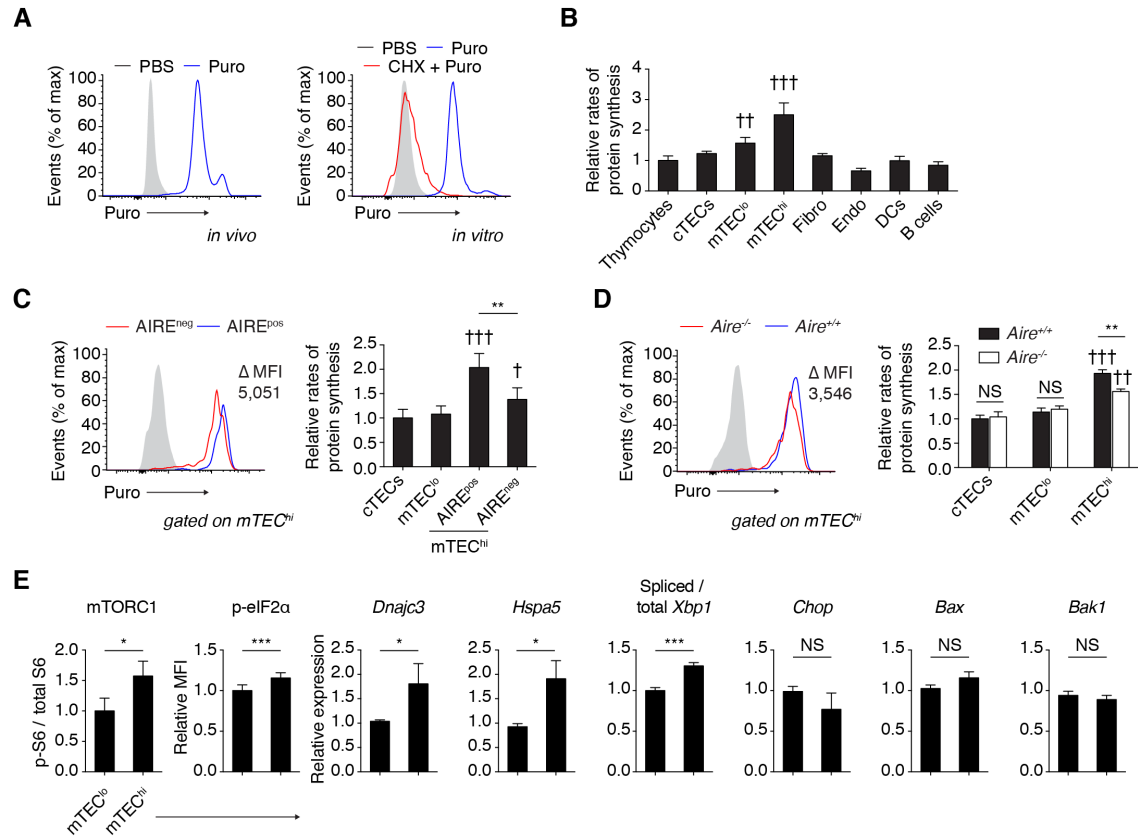


Figure 3.1 | Quantification of global protein synthesis in thymic cell populations in vivo. (A) Puromycin (Puro) incorporation in thymocytes *in vivo* (left panel) and in thymocytes treated or not with cyclohexamide (CHX) *in vitro* (right panel). (B) Protein synthesis rates in various thymic cell populations relative to unfractionated thymocytes (n = 17 mice from 4 independent experiments). (C) Puro incorporation in AIRE-negative and AIRE-positive mTEC^{hi} from *Aire*^{+/+} mice. Protein synthesis rates relative to cTECs are shown (n = 5 mice/group). (D) Puro incorporation in mTEC^{hi} from *Aire*^{+/+} and *Aire*^{-/-} littermates. Protein synthesis rates relative to *Aire*^{+/+} cTECs are shown (n = 3-5 mice/group). (E) mTORC1 activity was estimated from the levels of phosphorylated (p) S6 ribosomal protein normalized to total S6 (n = 6 mice from 2 independent experiments). Relative levels of p-eIF2α (Ser51) in mTEC subsets. For each mTEC subset, p-eIF2α mean fluorescence intensity (MFI) was subtracted with the autofluorescence background from isotype controls and then normalized to mTEC^{lo} (n = 6 mice). Relative mRNA expression (normalized to mTEC^{lo}) of adaptive (*Dnajc3*, *Hspa5*, and spliced *Xbp1*) and pro-apoptotic (*Chop*, *Bax*, and *Bak1*) UPR genes (n = 3). (A, C, and D) PBS-injected controls are depicted

as gray histograms. (B-D) Differences relative to thymocytes or cTECs were assessed using a repeated-measures one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test for multiple comparison ([†] $p < 0.05$, ^{††} $p < 0.01$, ^{†††} $p < 0.001$; NS, not significant). Data represent mean \pm SD. Mice were 6-8 weeks of age. See also Supplemental Figure 3.S1 and 3.S2.

mTEC^{hi} proliferate actively and cycling cells (i. e. from the G1 phase onwards) synthesize more proteins than quiescent cells (Supplemental Figure 3.S2C). However, even when focusing strictly on quiescent cells in G0, we observed that mTEC^{hi} incorporated more Puro than other cell subsets (Supplemental Figure 3.S2D, E). Hence, enhanced Puro incorporation in mTEC^{hi} cannot be solely ascribed to their relatively high proliferation rate. Next, we analyzed Puro incorporation in mTEC^{hi} from *Aire*^{+/+} and *Aire*^{-/-} littermates. In *Aire*^{+/+} mice, we studied both the AIRE-negative and AIRE-positive subsets of mTEC^{hi}. Relative to AIRE-positive WT mTEC^{hi}, protein synthesis was significantly diminished in WT AIRE-negative and *Aire*^{-/-} mTEC^{hi}, but remained superior to that observed in other TEC subsets (Figure 3.1C, D). We conclude that AIRE contributes to, but does not fully account for, the high translational activity of mTEC^{hi}.

The mTORC1 pathway is a major regulator of protein synthesis. Accordingly, the increased translational activity observed in mTEC^{hi} (Figure 3.1B) correlated with higher levels of phosphorylated S6 ribosomal protein, an mTORC1-dependent phosphorylation event (Figure 3.1E). Cells with hyperactivated mTORC1 have decreased translational fidelity and higher sensitivity to proteotoxic stress (Conn and Qian, 2013). To cope with proteotoxic stress, cells activate the unfolded protein response (UPR), a dynamic signaling network that orchestrates the recovery of proteostasis or triggers apoptosis, depending on the level of damage (Hetz et al., 2015). To help resolve proteotoxic stress, cells attenuate mRNA translation via protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)-dependent phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α , which is modestly but significantly increased in mTEC^{hi} relative to mTEC^{lo} (Figure 3.1E). Moreover, induction of the UPR leads to the transcription of inducible genes that encode key regulators of protein metabolism. Interestingly, we observed an upregulation of key chaperones (*Dnajc3*, *Hspa5*) involved in the UPR during endoplasmic reticulum stress and a significant upregulation of spliced *Xbp1*, a central activator of the IRE1 axis of the UPR (Figure 3.1E). However, that we detected similar transcript levels of pro-apoptotic genes (*Chop*, *Bax*, and *Bak1*) in mTEC^{lo} and mTEC^{hi} suggests that mTEC^{hi} are not in the apoptotic phase but rather in the early adaptive phase of the UPR.

3.7.2 IPs selectively regulate mTEC cellularity in a cell-autonomous manner

In the presence of increased protein synthesis, enhancing the cell's protein folding capacity via chaperone activity and increasing protein degradation represent two strategies that can prevent proteotoxic stress. Because the ubiquitin proteasome pathway is responsible for most of the protein degradation in mammalian cells, we hypothesized that the constitutive expression of IPs in mTECs could be important for maintaining proteostasis. Heretofore, it has been considered that IP expression in mTECs was essentially relevant to antigen presentation and negative selection (Klein et al., 2014). We first validated that the catalytic subunits are the sole proteasomal components that are differentially expressed in mTECs versus other epithelial cells, such as skin epithelial cells (ECs). While skin ECs express almost only CP catalytic subunits (*Psmb5*, *6*, and *7*), mTECs express similar levels of CP and IP subunits (*Psmb8*, *9*, *10*) (Figure 3.2A). However, genes coding for noncatalytic core and regulatory subunits showed similar expression in mTECs and skin ECs (Supplemental Figure 3.S3A).

To evaluate the role(s) of IPs in mTEC biology, we compared the thymi of WT mice to those of mice with targeted inactivation of genes encoding two IP subunits (*Psmb8* and *Psmb10*; hereafter referred to as double-knockout [dKO] mice). Because of the cooperative rules of IP catalytic subunit assembly, cells from these mice are almost totally IP deficient, because in addition to the total lack of PSMB8 and PSMB10, they contain low levels of PSMB9 (Supplemental Figure 3.S3B) (de Verteuil et al., 2014). Consistent with a previous report (Kincaid et al., 2011), we found that the frequency of CD8 single-positive thymocytes was decreased in dKO relative to WT mice (Figure 3.2B). FACS analyses showed no obvious defect in early thymocyte differentiation (Supplemental Figure 3.S4A, B), but revealed a slight increase in the proportion of thymic regulatory T cells (T_{reg}) in dKO mice (Supplemental Figure 3.S4C). Although analysis of T_{reg} development was not pursued further in this study, our morphological analysis of thymic cross-sections revealed that the size of medullary regions was significantly reduced in dKO thymi (Figure 3.2C). In line with this finding, we observed a marked decrease in TEC abundance and in the proportion of mTECs in dKO animals (Figure 3.2D). Indeed, while the number of cTECs

was unaffected, the number of mTEC^{lo} and mTEC^{hi} was considerably decreased in postnatal dKO mice (Figure 3.2E). Because carried over genetic elements can influence the analysis of genetically modified congenic mice (Vanden Berghe et al., 2015), we evaluated mTEC cellularity in the *Psmb8*^{-/-} and the *Psmb10*^{-/-} strains of mice that were crossed to generate dKO mice. The severe reduction in mTEC cellularity was present only in dKO mice (Figure 3.2F). Two points can be made from these data. First, differences in the genetic background are not likely to be responsible for the observed phenotype, and second, the loss of one IP catalytic subunit is not sufficient to induce mTEC hypocellularity. In dKO mice, IP deficiency is not restricted to the thymic epithelium. To determine whether the loss of mTECs in dKO mice was a cell-intrinsic phenomenon, we transplanted WT or dKO bone marrow cells in both WT and dKO recipients. Remarkably, dKO recipients of either WT or dKO bone marrow displayed an ~65% reduction in mTEC cellularity relative to WT recipients (Figure 3.2G). In other words, mTEC cellularity was dictated solely by the IP status of TECs, and was not affected by the presence of IPs in hematolymphoid cells. Taken together, these results show that IPs control mTEC cellularity in a cell-autonomous manner.

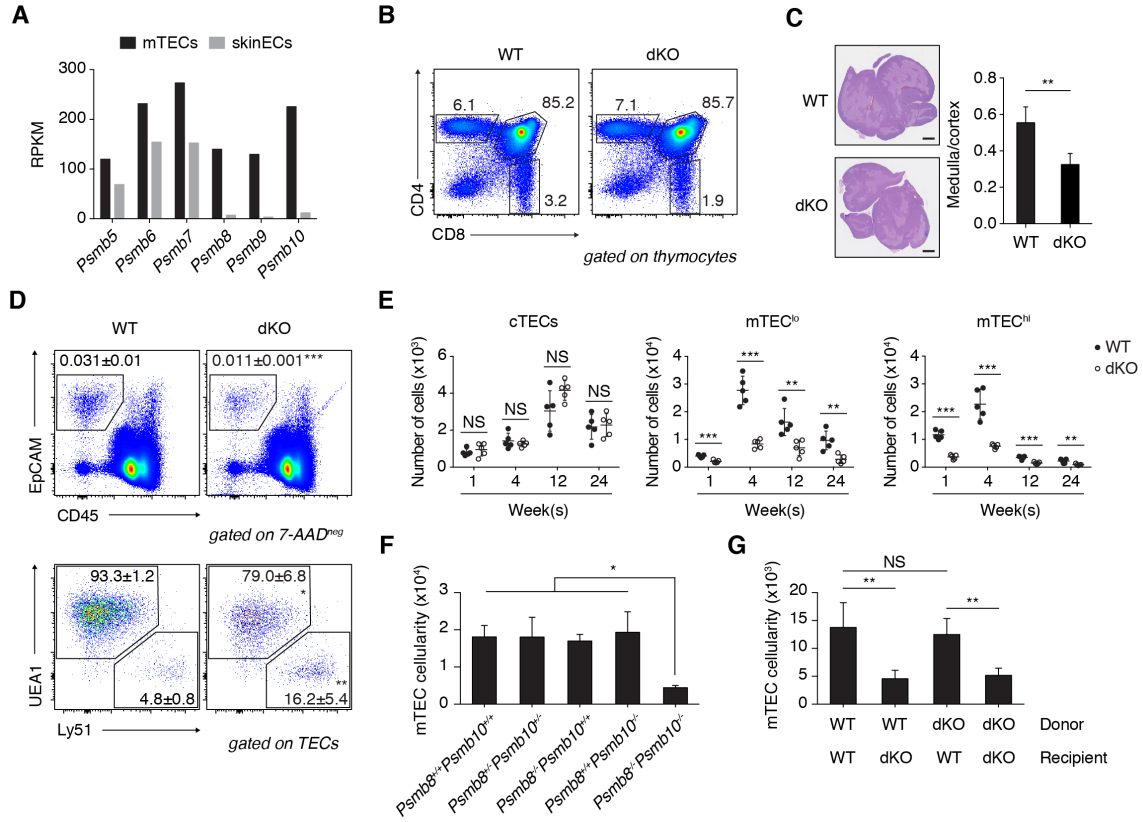


Figure 3.2 | Impact of IP-deficiency on TEC cellularity. (A) Expression of genes coding for catalytic subunits of CPs (*Psmb5*, *Psmb6*, and *Psmb7*) and IPs (*Psmb8*, *Psmb9*, and *Psmb10*) in mTECs and skin epithelial cells (skinECs) (GSE44945). RPKM, reads per kilobase per million mapped reads. (B) Flow cytometric analysis of CD4 and CD8 single-positive and double-positive thymocytes in 4-week-old WT and dKO mice (n = 4-5 mice/group). (C) Histological thymus tissue sections of 4-week-old WT and dKO mice. H&E staining is shown with the morphological analysis of cortical and medullary regions (n = 4 mice/group). Scale bars, 1 mm. (D) Percentage of TECs (CD45⁺EpCAM⁺), cTECs (Ly51⁺UEA1⁻) and mTECs (Ly51⁻UEA1⁺) in 4-week-old WT and dKO mice (n = 6-10 mice/group). (E) Cellularity of cTECs, MHCII^{lo} mTECs (mTEC^{lo}) and MHCII^{hi} mTECs (mTEC^{hi}) at different time points (weeks) after birth in WT and dKO mice (n = 5 mice/group, 2 independent experiments). (F) mTEC cellularity in 2-month-old WT (*Psmb8*^{+/+}*Psmb10*^{+/+}), heterozygous (*Psmb8*^{+/+}*Psmb10*^{+/+}), single-knockout (*Psmb8*^{-/-}*Psmb10*^{+/+}, *Psmb8*^{+/+}*Psmb10*^{-/-}) and dKO (*Psmb8*^{-/-}*Psmb10*^{-/-}) littermates (n = 4 mice/group). (G) mTEC cellularity of reciprocal bone marrow chimeras generated by the

transfer of WT or dKO bone marrow into WT or dKO recipient mice (n = 4 mice/group).
Data represent mean \pm SD. See also Supplemental Figure 3.S3 and 3.S4.

3.7.3 IP deficiency results in autoimmunity

Given the essential role of the thymic medulla in the establishment of central tolerance, we next assessed whether dKO mice develop multiorgan inflammatory cell infiltrates. Histological analyses revealed marked perivascular and interstitial infiltrates in multiple organs in 1-year-old dKO mice compared to age-matched WT controls (Figure 3.3A, B). We did not observe any sex-related bias in autoimmune susceptibility in 1-year-old dKO animals, since most organs showed inflammatory cell infiltrations in both male and female mice (Figure 3.3B). The autoimmune manifestations in dKO mice were mild, and in mice fed with a normal diet (11% fat), they did not lead to diabetes or kidney dysfunction (Figure 3.3C). Inflammatory cell infiltrates were also present (but less abundant), in “young” 10-week-old dKO mice (Figure 3.3D). This immunopathology is less severe than what is observed in RelB-deficient mice, which have an almost complete lack of mTECs and develop prominent inflammatory cell infiltrates in multiple organs 3 weeks after birth (Weih et al., 1995). Nevertheless, the presence of inflammation in the pancreas and stomach of 10-week-old dKO animals (Figure 3.2D) coincided with the onset of autoimmunity in Aire-deficient mice, which is typically observed 10-15 weeks after birth (Anderson et al., 2002). To definitively ascertain whether lack of IPs only in mTECs was sufficient to explain the autoimmune manifestations found in dKO mice, we grafted lymphoid cell-depleted thymi from WT and dKO mice under the kidney capsule of athymic nude recipient mice (designated WT/nu and dKO/nu, respectively). As expected, our thymic grafts showed clear cortical and medullary regions and supported normal thymopoiesis 8 weeks after transplantation (Figure 3.3E). Consistent with the selective mTEC deficit in postnatal dKO mice (Figure 3.2E), the number of mTECs, but not cTECs, was dramatically reduced in the ectopic thymi that developed in dKO/nu mice after 16 weeks of reconstitution (Figure 3.3F). Hence, transplantation of dKO thymi in nude recipients recapitulates the selective deficit in mTECs observed in untransplanted dKO thymi. Moreover, whereas mice bearing the thymus of a WT donor showed no or minimal infiltrations in peripheral tissues, we noted a much higher incidence of inflammatory cell infiltration in mice that received thymic stroma from dKO mice (Figure 3.3G, H). We

therefore conclude that selective absence of IPs in mTECs is sufficient to cause autoimmune manifestations.

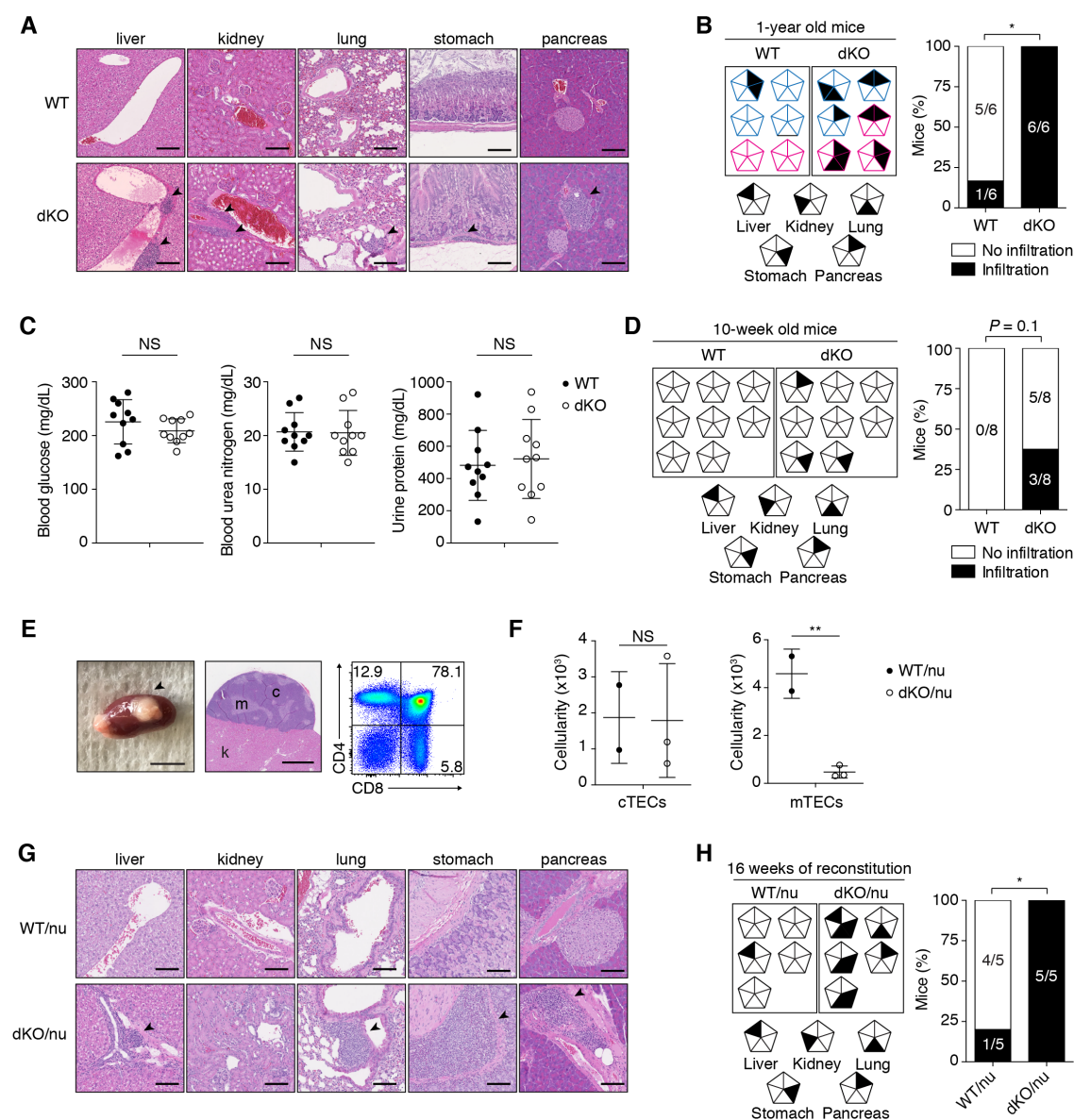


Figure 3.3 | Loss of IPs in mTECs leads to autoimmune manifestations. (A) Inflammatory cell infiltration in peripheral tissues from 1-year-old WT and dKO mice. (B) Schematic representation of inflammatory cell infiltration into peripheral tissues of 1-year-old WT and dKO mice ($n = 6$ mice/group). Male and female mice are represented as blue and pink pentagons, respectively. (C) Clinical markers of pancreatic (glucose) and renal function (urea, proteinuria). Blood and urine samples were collected from 1-year-old WT and dKO mice ($n = 10$ mice/group). (D) Schematic representation of inflammatory cell infiltration into peripheral tissues of 10-week-old WT and dKO mice ($n = 8$ mice/group). (E) Representative image of a thymic lobe transplanted under the kidney capsule of nude

recipient mice after 8 weeks of reconstitution (left; scale bar, 5 mm). H&E staining of transplant cross-section is shown (middle; scale bar, 1 mm). c, cortex; k, kidney; m, medulla. Flow cytometric analyses of CD4 and CD8 thymocyte development in the ectopic thymus of grafted mice after 8 weeks of reconstitution (right). (F) cTEC and mTEC cellularity in the ectopic thymus of WT/nu and dKO/nu mice (n = 2-3 mice/group) after 16 weeks of reconstitution. (G) Inflammatory cell infiltration in peripheral tissues from WT/nu and dKO/nu mice after 16 weeks of reconstitution (n = 5 mice). (H) Schematic representation of inflammatory cell infiltration into peripheral tissues of WT/nu and dKO/nu mice after 16 weeks of reconstitution (n = 5 mice/group). (A and G) H&E staining is shown. Each arrow represents inflammatory cell infiltration. Scale bars, 150 μ m. (B, D, and H) Each pentagon represents an individual mouse. Infiltrations are depicted as filled regions for various organs. The Fisher's exact test was used to compare the extent of inflammatory cell infiltration in WT versus dKO mice cohorts (* $p < 0.05$). (C and F) Data represent mean \pm SD.

3.7.4 Mature mTECs from IP-deficient mice have a reduced half-life

Next, we analyzed TEC turnover to understand how IPs could influence mTEC cellularity. First, we tracked the fate of TEC subpopulations by bromodeoxyuridine (BrdU) pulse labeling in young adult mice. BrdU was injected daily for 3 consecutive days to provide a labeling pulse, after which BrdU was withdrawn and TEC label retention analyzed after 1 day and 14 days of chase (Figure 3.4A). After 1 day of chase, BrdU incorporation was conspicuous throughout all TEC subsets, indicating active DNA synthesis in these cells. Consistent with a previous report, the proportion of BrdU⁺ cells was higher in mTEC^{hi} than in other TEC compartments (Gray et al., 2006). However, FACS analysis revealed no significant differences in the frequencies of BrdU⁺ TEC subsets in WT and dKO mice after 1 day of chase, indicative of similar proliferative capacities (Figure 3.4B, left). This result was further validated using Ki-67 labeling, which discriminates cycling from quiescent cells (Figure 3.4C). However, after 14 days of chase, the proportion of BrdU⁺ cells was significantly lower in dKO mTEC^{hi} than in WT mTEC^{hi} (Figure 3.4B, right). We therefore conclude that WT and dKO mTEC^{hi} display similar proliferation rates but that dKO mTEC^{hi} have a shorter lifespan.

Nuclear factor κ B (NF- κ B) and tumor necrosis factor signaling regulate mTEC differentiation, and mice deficient in receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK), CD40, or LT β R have a small thymic medulla and develop autoimmunity (Akiyama et al., 2008; Chin et al., 2003). Because IPs and CPs differentially regulate the activation of these signaling pathways (de Verteuil et al., 2014), we surmised that mTEC defects in dKO mice could result from dysregulated mTEC differentiation. We therefore isolated mTEC^{lo} and mTEC^{hi} from WT and dKO mice and analyzed the mRNA expression profiles of genes that control mTEC differentiation and thymic medulla formation. Transcriptomic analyses revealed similar expression of *Tnfrsf11a*, *Ltbr*, *Traf6* and other mTEC-associated genes in WT and dKO mTECs (Figure 3.4D). Interestingly, we found no difference in the expression of *Cd40* and *RelB*. This suggests that CPs and IPs have no divergent effects on the expression of NF- κ B-dependent transcripts in mTECs. Furthermore, while mTEC differentiation correlates with enhanced pGE, we found no differences in the expression of classic promiscuously expressed transcripts in WT versus dKO mTEC subsets (Figure

3.4D). Also, we observed that both the proportion of CD80^{lo}MHCII^{lo}, CD80^{hi}MHCII^{hi} mTECs and AIRE-positive mTEC^{hi} were largely unaffected by the loss of IPs, indicative of normal mTEC differentiation in dKO mice (Figure 3.4E). However, relative to WT mice, dKO mice showed an increased proportion of apoptotic (Annexin-V⁺ and 7-AAD⁺) cells in the mTEC^{hi}, but not the mTEC^{lo} or cTEC compartment (Figure 3.4F). Collectively, these results show that the shorter half-life of mTEC^{hi} from dKO mice results from premature apoptosis.

In order to evaluate whether the total amount of proteasomes was different in WT and dKO mTEC^{hi}, we conducted two series of experiments. First, we found that the amount of core proteasome alpha 6 subunits (PSMA6; present in both CPs and IPs) was similar in WT and dKO mTEC^{hi} (Figure 3.4G). Second, using a proteasome probe that binds with similar affinities to all proteasome catalytic sites, and thereby enables a precise estimation of the total amounts of functional proteasomes (Berkers et al., 2007), we found that WT and dKO mTEC^{hi} contained similar amounts of proteasomes (Figure 3.4H). From these results, we conclude that discrepancies in the homeostatic maintenance of WT versus dKO mTEC^{hi} are due to qualitative differences in proteasome composition and not to quantitative differences in the abundance of proteasomes.

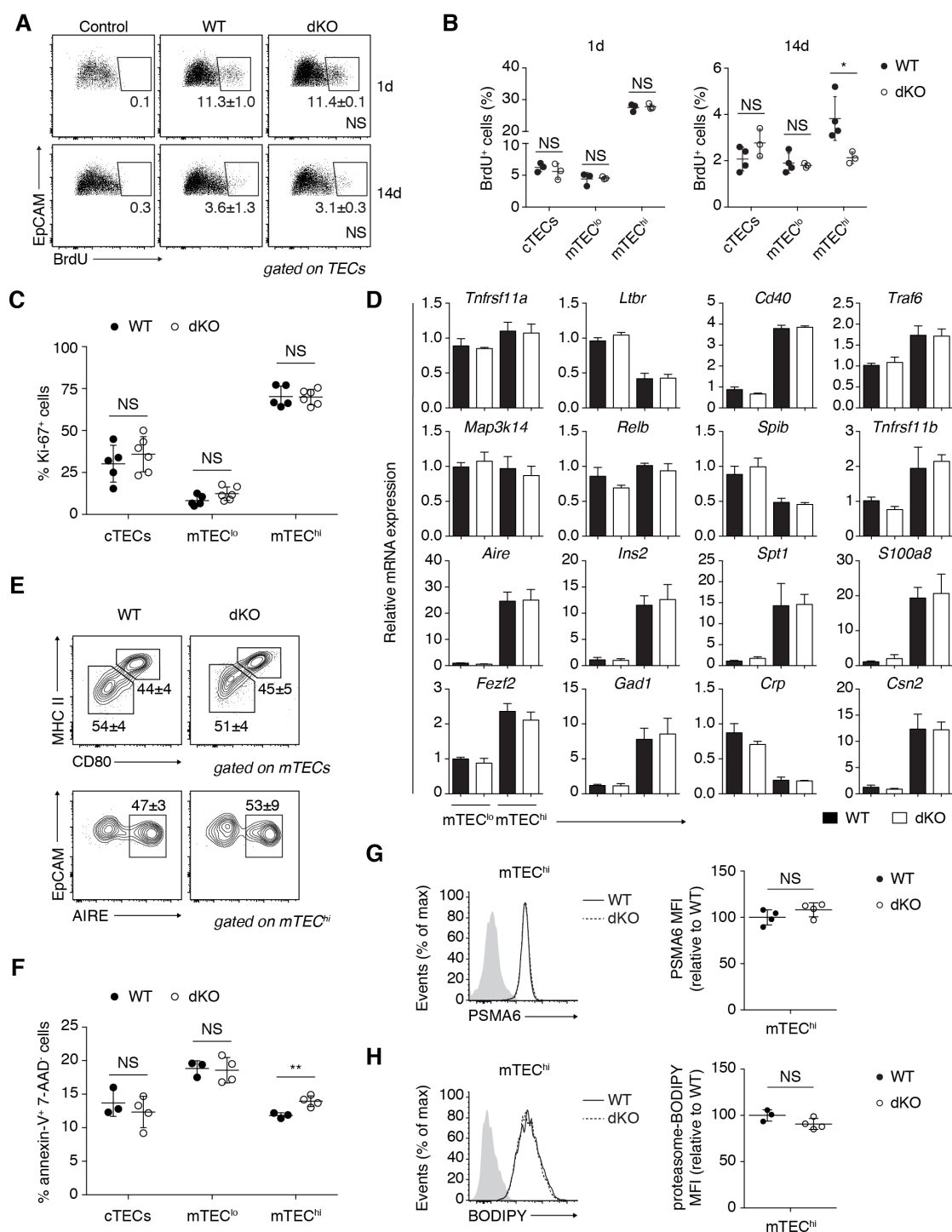


Figure 3.4 | Developmental dynamics of mTECs in IP-deficient mice. (A) Flow cytometric analysis of BrdU incorporation in WT and dKO TECs 1 day and 14 days after BrdU withdrawal. Representative profiles are shown with the frequencies of BrdU⁺ cells in the indicated areas (n = 3-4 mice/group). (B) Proportion of BrdU⁺ cells within TEC

subsets in WT and dKO mice after a 1-day (left panel) and 14-day (right panel) chase period (n = 3-4 mice/group). (C) Frequency of Ki-67⁺ TECs in WT and dKO mice (n = 5-6 mice/group). (D) Relative mRNA expression of indicated genes in mTEC subsets from WT and dKO mice (normalized to WT mTEC^{lo}) (n = 3/group). (E) CD80 and MHC class II expression on gated mTECs and AIRE protein expression on gated mTEC^{hi} (n = 4-8 mice/group). (F) Frequency of Annexin-V⁺ 7-AAD⁻ TECs in WT and dKO mice (n = 3-4 mice/group). (G) Flow cytometric analysis of the 20S proteasome alpha 6 subunit (PSMA6) in WT and dKO mTEC^{hi} (n = 4 mice/group). (H) Flow cytometric analysis of proteasome content in WT and dKO mTEC^{hi} based on proteasome-BODIPY staining (n = 3-4 mice/group, 2 independent experiments). (G and H) Isotype controls are depicted as gray histograms. Mice were 6-8 weeks of age. Data represent mean \pm SD.

3.7.5 Defective regenerative capacity of adult mTECs in IP-deficient mice

The presence of TEC progenitors in the adult thymus is now well established. We therefore hypothesized that the shortened half-life of dKO mTEC^{hi} should increase the pace of mTEC replacement and could thereby lead to the exhaustion of mTEC progenitors. We therefore examined adult thymic medullary regeneration after systemic administration of polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)). We selected this strategy because poly(I:C) can directly trigger interferon- α -mediated damage in TECs (Papadopoulou et al., 2011), while other approaches (e.g., sub-lethal whole body irradiation) predominantly affect thymocytes. Injection of a literature consensus dose of poly(I:C) induced rapid thymic involution in both WT and dKO mice, as depicted by the ~70% decrease in mTEC^{hi} cellularity at the 4-day time point (Figure 3.5A). 18 days after the first injection, we observed a near complete recovery of mTEC^{hi} cellularity in poly(I:C)-injected WT mice, indicating effective mTEC progenitor activity. However, unlike their WT counterparts, mTEC^{hi} from dKO mice failed to return to their baseline cellularity level (Figure 3.5A). Hence, IPs are essential for maintaining the regenerative potential of postnatal mTEC^{hi}.

Next, we asked whether defective mTEC^{hi} regeneration after thymic injury in dKO mice was due to a decreased clonogenic potential of TEC progenitors. To this end, we investigated the colony-forming efficiency (CFE) of FACS-sorted TECs from 2-month-old WT and dKO mice (Supplemental Figure 3.S5A). Because we made no *a priori* assumption as to the phenotype of progenitor cells, we analyzed TEC colonies formed by EpCAM⁺CD45⁻ TECs having a cTEC (Ly51⁺UEA1⁻) or mTEC (Ly51⁻UEA1⁺) phenotype. First, we confirmed the clonal origin of TEC colonies in mixing experiments; while nonspecific cell aggregation would generate bichromatic colonies, 100% of our colonies were monochromatic (Figure 3.5B). After 7 days in culture, we observed defined colonies that could be readily detected with fluorescent phalloidin, which stains F-actin (Figure 3.5C). We made two observations which are consistent with a previous report (Kim et al., 2015): (1) TEC clonogenic activity decreased with age as depicted by the ~4-fold decrease in CFE between neonatal and 2-month-old WT TECs, and (2) cTECs formed more colonies

than mTECs (Figure 3.5D). However, the salient finding was that TECs from 2-month-old WT and dKO mice formed colonies at similar frequencies (Figure 3.5D).

We then analyzed the composition of TEC colonies from 2-month-old WT and dKO mice by staining with antibodies against cytokeratin 5 (K5) and cytokeratin 8 (K8) (Supplemental Figure 3.S5A). Whereas mTECs are $K5^{+}K8^{-}$, cTECs are mostly $K5^{-}K8^{+}$ (Gray et al., 2006). We observed two types of TEC colonies: mixed colonies (~75% of observed colonies in both WT and dKO mice) containing both $K5^{-}K8^{+}$ and $K5^{+}K8^{+}$ cells (Figure 3.5E) and homogeneous colonies (~25%) consisting entirely of $K5^{-}K8^{+}$ cells (Supplemental Figure 3.S5B, C). Consistent with the concept that mTECs originate from bipotent precursors (Ulyanchenko et al., 2016), we did not observe colonies with $K5^{+}K8^{-}$ cells only. Nonetheless, the key point is that we found a major discrepancy in the cell composition of mixed colonies formed by WT vs. dKO TECs (Figure 3.5E, F). Indeed, while most WT mixed colonies contained a high proportion of $K5^{+}$ cells, most dKO mixed colonies contained only few K5-expressing cells. Taken together, these results show that adult WT and dKO TECs contain similar numbers of progenitors, but that these progenitors have lost their ability to generate mTECs in dKO mice. Overall, the phenotype of dKO mTEC progenitors is strikingly similar to that of aging exhausted hematopoietic stem cells; their regenerative potential (as measured in transplantation assays) decreases, and they display a skewed differentiation potential (Akunuru and Geiger, 2016).

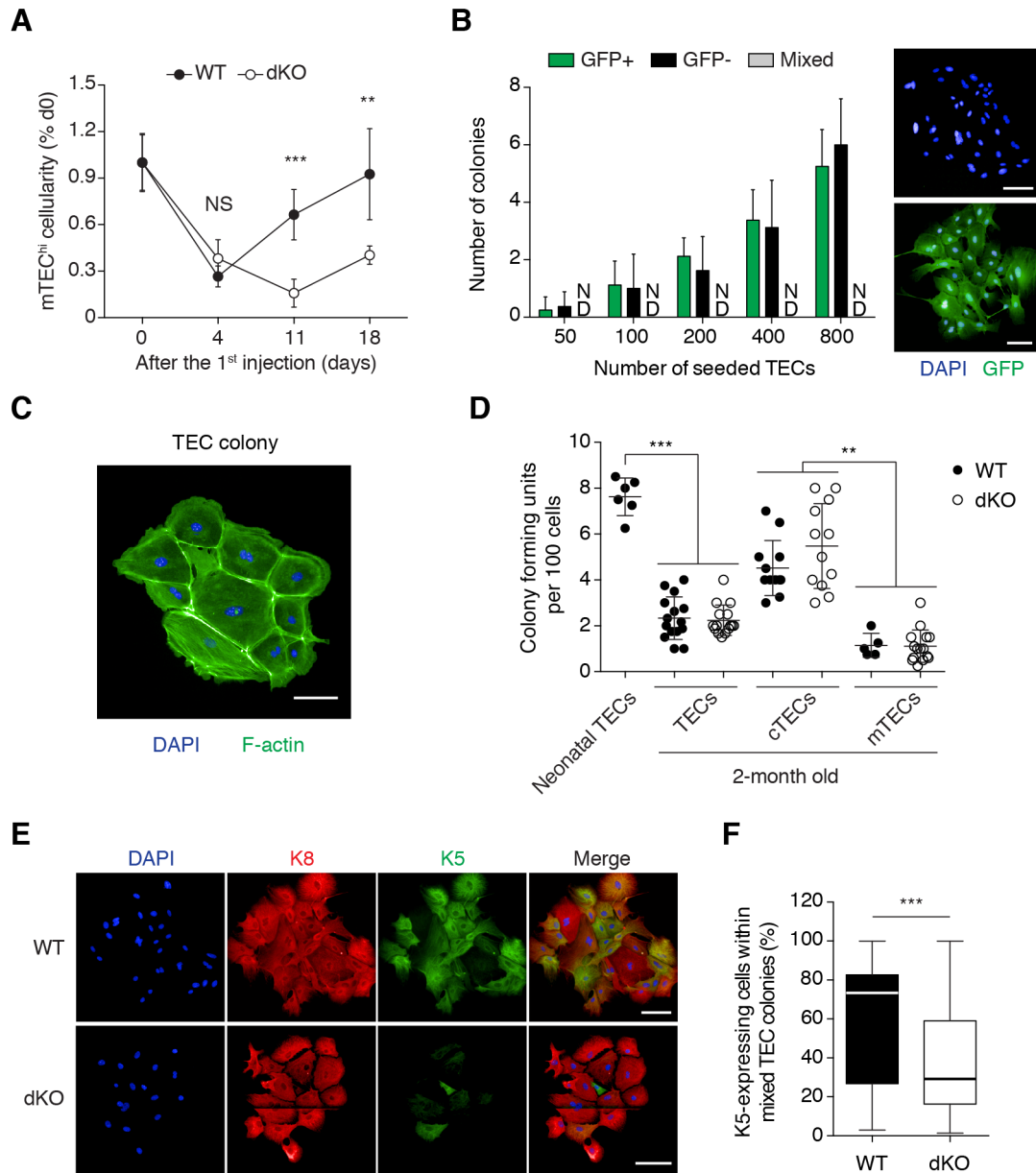


Figure 3.5 | Regenerative potential and mTEC progenitor activity in IP-deficient mice. (A) Cellularity of mTEC^{hi} in WT (filled circles) and dKO mice (open circles) at the indicated recovery time points after systemic poly(I:C) administration (n = 3-9 mice/group, from 2 independent experiments). (B) Histograms show the number of colonies observed from mixed (1:1) WT/CAG-EGFP TEC cultures at increasing cell densities. Representative images of monochromatic GFP⁺ and GFP⁻ TEC colonies are shown. Scale bar, 100 μ m. (C) Representative image of a TEC colony stained with DAPI (blue) and fluorescent phalloidin (green). Scale bar, 100 μ m. (D) Colony forming efficiency (CFE) of WT and

dKO TEC subsets illustrated as colony forming units per 100 seeded cells ($n = 5-15$ replicate wells per condition, 3 independent experiments). (E) Representative immunofluorescence images of WT and dKO TEC colonies stained for K8 (cTEC marker), K5 (mTEC marker) and counterstained with DAPI ($n = 42$ to 68 colonies, 3 independent experiments). Scale bars, $100\ \mu\text{m}$. (F) Box plots showing the frequency of K5-expressing cells within WT and dKO TEC colonies of mixed lineages. The bottom and top of the box represent the first and third quartiles, and the line inside the box is the median. Whiskers represent the min and max values. (B, C, and E) Composite image obtained with an Operetta microscope using the Harmony high content imaging and analysis software version 4.1. See also Supplemental Figure 3.S5.

3.7.6 IPs alleviate proteotoxic stress in mTECs

We next wished to directly evaluate whether IPs in mTECs might alleviate proteotoxic stress, which impinges on cell function and viability. Interestingly, we found that under steady-state physiological conditions, mTEC^{lo} and mTEC^{hi} from dKO mice show increased levels of phospho-eIF2 α relative to WT mTECs (Figure 3.6A). Consistent with PERK-dependent phosphorylation of eIF2 α , we found that mTEC^{hi} from dKO mice show a ~20% decrease in protein synthesis rates as compared to WT controls (Figure 3.6B). However, WT and dKO mTECs show similar expression of spliced *Xbp1*, a transcriptomic marker of the IRE1 arm of the UPR (Figure 3.6C). Taken together, these results show that PERK signaling is selectively activated in mTEC^{hi} from adult dKO mice.

To find additional evidence of proteotoxic stress in dKO mTECs, we developed an *in vitro* model of pharmacological induction of proteotoxic stress using fetal thymic organ cultures (FTOCs). In order to induce proteotoxic stress, we used tunicamycin, a model chemical for induction of proteotoxic stress in tissue culture systems. Because tunicamycin disrupts protein folding in the endoplasmic reticulum and induces a robust activation of all branches of the UPR, it causes an acute stress, similar to what is observed when the thymus undergoes acute involution (Dooley and Liston, 2012). We treated WT and dKO lymphoid cell-depleted FTOCs with tunicamycin (Figure 3.6D) and compared cTECs and mTECs in treated versus untreated organs. Given that >85% mTECs qualify as mTEC^{hi} (i.e., MHCII^{hi}) in the embryonic day (E14.5) thymi used for our FTOC experiments (Supplemental Figure 3.S6), we only considered the bulk mTEC population in these analyses. In WT FTOCs, tunicamycin treatment did not affect the proportion of live (7-AAD⁻) cTECs or mTECs (Figure 3.6E). In addition, tunicamycin treatment did not affect cTEC (Ly51⁺UEA1⁻) cellularity in either WT or dKO FTOCs (Figure 3.6F, left). The key finding was that, unlike WT FTOCs, dKO FTOCs displayed an ~2-fold reduction in mTEC (Ly51⁺UEA1⁺) numbers in tunicamycin-treated versus untreated controls (Figure 3.6F, right). We conclude that IPs preserve cell viability in mTECs exposed to proteotoxic stress.

In parallel, we analyzed the transcript levels of classic proteotoxic stress-induced genes in FACS-sorted mTECs. Strikingly, compared to WT mTECs, we observed a much more

drastic upregulation of central UPR mediators (*Hspa5* [BiP], *Ddit3* [CHOP], *Atf4*, and *sXbp1*) in tunicamycin-treated dKO mTECs (Figure 3.6G). This trend was also observed for other proteotoxic-stress-induced genes involved in protein binding, folding and degradation (*Pdia3*, *Hsp90b1*, *Dnajc3*, *Dnajb9*, and *Edem1*). mTECs from tunicamycin-treated WT FTOCs showed only modest upregulation of these genes, indicating that IP-sufficient mTECs can deal with proteotoxic stress more efficiently than dKO mTECs (Figure 3.6G). Heat-shock factor 1 (HSF1) is the predominant transcription factor coordinating the heat-shock response, which enhances the cells' protein folding capacity during proteostasis imbalance (Eisele et al., 2015). However, *Hsf1* was not significantly upregulated by tunicamycin treatment in WT or dKO mTECs, indicating that the heat-shock response was not induced in our *in vitro* system. Notably, we observed a significant upregulation of the *Bad* and *Bax* pro-apoptotic genes in mTECs from tunicamycin-treated dKO FTOCs, thus offering a likely explanation for their decreased cellularity (Figure 3.6G). Taken together, these results show that IPs play a nonredundant role in mTECs by alleviating proteotoxic stress.

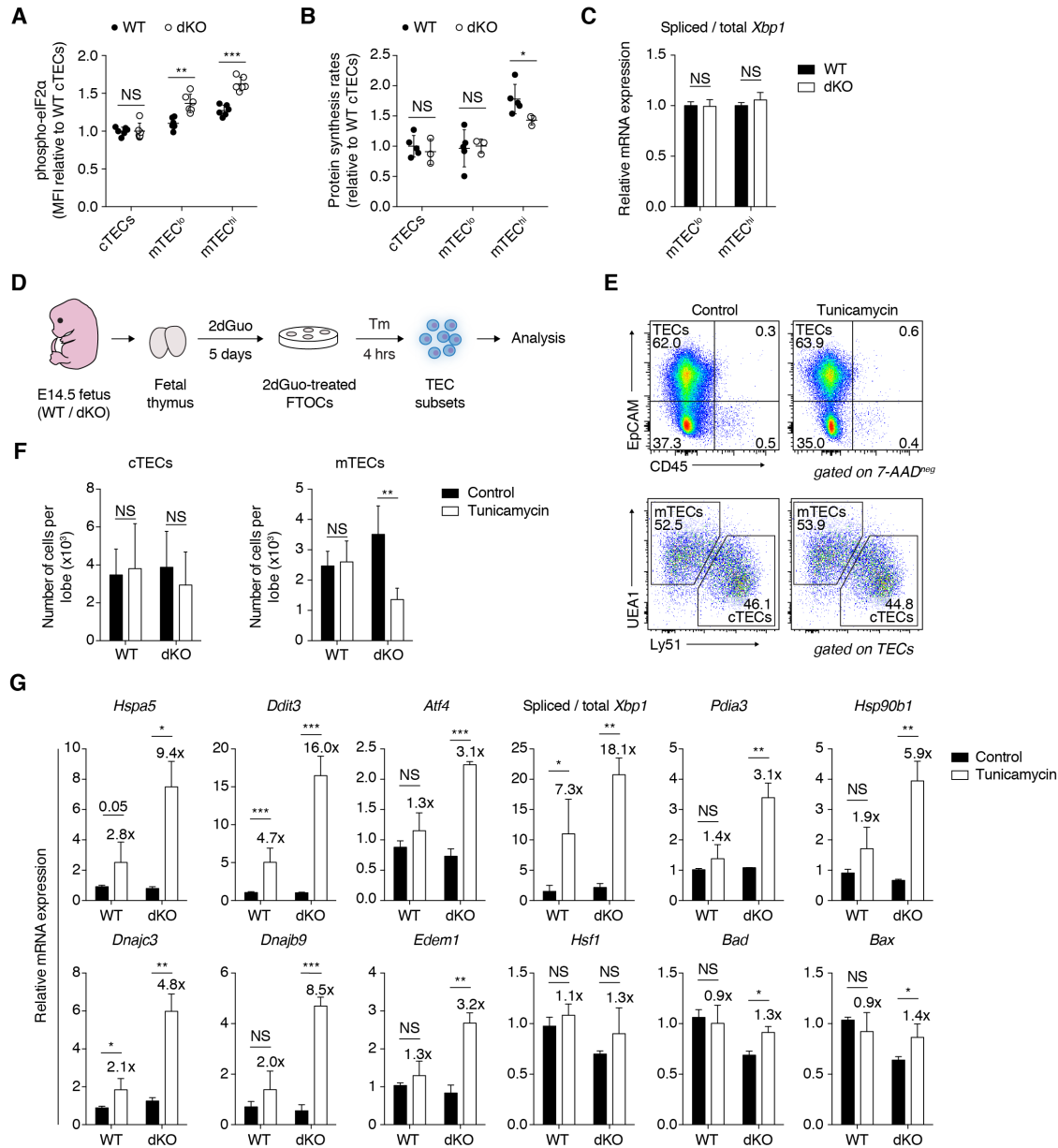


Figure 3.6 | IPs alleviate proteotoxic stress in mTECs. (A) Relative levels of phospho (Ser51)-eIF2 α in TEC subsets from 6- to 8-week old WT and dKO mice. For each TEC subset, the autofluorescence background from isotype controls was subtracted, and phospho-eIF2 α mean fluorescence intensity (MFI) was then normalized to WT cTECs (n = 6 mice/group). (B) Protein synthesis rates (normalized to WT cTECs) in TEC subsets from 6- to 8-week old WT and dKO mice (n = 3-5 mice/group). (C) Relative mRNA expression (normalized to WT) of spliced / total *Xbp1* in WT and dKO mTEC subsets (n = 3/group). (D) Pharmacological induction of proteotoxic stress in FTOCs. Thymic lobes

were incubated for 5 days with 2'-deoxyguanosine (2dGuo) to deplete lymphoid cells and treated with tunicamycin (Tm) for 4 hr to induce proteotoxic stress. (E) Proportion of TECs (CD45⁻EpCAM⁺), cTECs (Ly51⁺UEA1⁻) and mTECs (Ly51⁻UEA1⁺) in control versus tunicamycin-treated WT FTOCs (n = 3 per group). (F) Cellularity of cTECs and mTECs in WT and dKO FTOCs treated or not with tunicamycin (n = 3-5 per group). (G) Relative mRNA expression of indicated proteotoxic-stress-induced genes in WT and dKO mTECs from control and tunicamycin-treated FTOCs (n = 3-5 per group). Gene expression is normalized to WT controls. Numbers indicate the fold induction between tunicamycin-treated (black bars) and control samples (white bars) for both WT and dKO mTECs. Data represent mean \pm SD. See also Supplemental Figure 3.S6.

3.8 Discussion

While pGE is the key process enabling mTECs to establish self-tolerance, our data show that the price to pay for pGE is increased protein biogenesis and higher susceptibility to proteotoxic stress. Although pGE is organized as coordinated clusters of co-expressed genes in single mTECs (Meredith et al., 2015), our results show that, compared to other cell populations, mTEC^{hi} have intrinsically higher protein synthesis rates. This scenario is akin to oncogene-driven proteotoxic stress in cancer cells. For example, overexpression of the c-Myc oncoprotein promotes the expression of ~15% of protein-coding genes, and thereby causes proteotoxic stress (Harper and Bennett, 2016). Likewise, non-neoplastic cells with intrinsically high translational activity must deal with proteotoxic stress. This is well illustrated by pancreatic beta cells in which inter-individual variation vulnerability to stress determines susceptibility to type 1 and type 2 diabetes (Liston et al., 2017). Importantly, enhancement of ribosomal protein synthesis comes at the cost of fidelity (Conn and Qian, 2013). Amino acid misincorporation during protein translation leads to accumulation of toxic unfolded protein aggregates. We believe that chronic proteotoxic stress offers a likely explanation for the rapid turnover of mTECs (Gray et al., 2006). Nonetheless, we speculate that proteotoxic stress may increase the scope of central tolerance via two mechanisms. First, errors in translation generate defective ribosomal products which are the preferred substrates of the MHC class I presentation pathway (Yewdell, 2011). Second, apoptosis of mTEC^{hi} should facilitate the constitutive and unidirectional transfer of antigens from mTECs to thymic dendritic (DCs). Cross-presentation of mTEC-derived antigens by thymic DCs is instrumental in central tolerance (Koble and Kyewski, 2009).

The current dogma holds that the predominant role of IPs in mTECs is to generate self-peptides presented by MHC class I molecules for negative selection. The present work shows that a crucial role of IPs is to regulate mTEC homeostasis and function by enabling mTECs to withstand proteotoxic stress. Moreover, considering that our dKO mice still have trace amounts of PSMB9, we might have slightly underestimated the role of IP subunits. Of note, dKO mice, in which IPs are replaced by CPs, show premature thymic involution, characterized by a selective loss of mTEC cellularity. It is noteworthy that deletion of both

PSMB8 and PSMB10 subunits was required to decrease mTEC cellularity (Figure 3.2F). Hence, consistent with a recent report (Hewing et al., 2017), the single deletion of PSMB8 (LMP7) appears insufficient to cause proteotoxic stress. Additionally, using *in vivo* approaches (i.e., thymus transplantation, systemic poly(I:C) administration), we showed that IP deficiency has a dramatic impact on the regenerative potential of mTECs. We therefore posit that the following chain of events occurs in dKO mTECs: (1) increased proteotoxic stress in mTEC^{hi}, (2) exacerbated UPR, (3) exhaustion of mTEC progenitors and (4) failure to maintain the mTEC compartment. As a correlate, we speculate that, similar to IPs, proteotoxic stress response genes must play important roles in the homeostatic maintenance of mTECs and their ability to establish central tolerance.

IPs and their orthologs have been shown to play nonredundant roles in non-immune cells in both vertebrates and invertebrates. Consistent with the present report, IPs are particularly important for maintaining stemness in a variety of stem/progenitor cells, as well as tissue repair capacity (Atkinson et al., 2012; Ferrington et al., 2008), yet the regulators of IP expression in mTECs remain to be identified. In non-inflamed tissues, interferon γ -independent expression of IPs over CPs has been reported in cells submitted to various types of cellular stress (Seifert et al., 2010). For instance, IP upregulation has been described in neurodegenerative diseases whose pathogenesis depend on toxic protein accumulation (Díaz-Hernández et al., 2003; Mishto et al., 2006). Therefore, we speculate that increased proteotoxic stress could represent a major determinant of IP expression in mTECs. It is also important to consider that IP-encoding genes (i.e., *Psmb9* and *Psmb10*) are targets of the Foxn1 transcription factor, which can differentially regulate IP expression in mTECs (Žuklys et al., 2016).

In preclinical models, strategies aimed at improving proteostasis may slow down the hallmarks of aging (Kaushik and Cuervo, 2015; López-Otín et al., 2013). Interestingly, proteasome activity decreases gradually with age in several eukaryotic cells (Saez and Vilchez, 2014). In contrast, long-lived animal species such as the naked mole rat, maintain high proteasome activity throughout its life. This confers a selective advantage by reducing the proteotoxic load during aging, thus improving lifespan and healthspan (Pérez et al., 2009; Pickering et al., 2015). However, whether IP activity or expression also decreases

with age in mTECs remains an open field of investigation. Further studies are thus warranted to determine whether long term mitigation of proteotoxic stress in mTECs might prevent or reverse age-associated thymic involution.

3.9 Experimental Procedures

3.9.1 Mice

Mice were bred and housed under specific-pathogen-free conditions in sterile ventilated racks at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC). All procedures were in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux de l'Université de Montréal. Mice were maintained in a 12-hr/12-hr light/dark cycle with access to water and fed with a normal diet (65% calories from carbohydrate, 11% from fat, and 24% from protein). Unless indicated otherwise, 4- to 10-week old age- and gender-matched adult mice were used for all *in vivo* experiments. For timed matings, noon of the day of the vaginal plug observation was designated as E0.5. See the Supplemental Experimental Procedures for more details on mouse strains.

3.9.2 Flow cytometry and cell sorting

Thymi were isolated and stromal cell enrichment was performed as described (Jain and Gray, 2014; St-Pierre et al., 2015) prior to antibody staining (see Supplemental Experimental Procedures).

3.9.3 Measurement of protein synthesis

For *in vivo* analysis, puromycin (50 mg/kg body mass) in PBS was injected intraperitoneally to 6- to 8-week old mice. 1 hr later, mice were euthanized, thymic cells isolated and stained with combinations of antibodies against cell-surface markers. After extracellular staining and washing, cells were fixed, permeabilized and stained with Alexa Fluor 647 anti-puromycin antibody (EMD Millipore) (see Supplemental Experimental Procedures).

3.9.4 BrdU administration

Mice received daily intraperitoneal injection (3 doses in total) of 1.5 mg of BrdU (BD Biosciences). BrdU uptake was detected at the indicated time points using a BrdU Flow Kit (BD Biosciences) following the manufacturer's instructions.

3.9.5 Poly (I:C) treatment

Mice were intraperitoneally injected with 250 µg poly(I:C) (InvivoGen) twice at a 3-day interval and euthanized at the indicated recovery time points.

3.9.6 Fetal thymic organ cultures

Thymic lobes were isolated from E14.5 WT and dKO embryos and cultured on Isopore membrane filters (Millipore) placed on Gelfoam sponge (Pfizer) floated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 50 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, and 100 U/mL penicillin / streptomycin (Life Technologies) (see Supplemental Experimental Procedures).

3.9.7 Statistical analysis

Unless stated otherwise, all values are expressed as mean \pm SD, and sample sizes of at least $n = 3$ were used for statistical analyses. Unless indicated otherwise, n refers to the number of individual mice analyzed per cohort. Statistical differences between two groups were calculated with a two-tailed Student's t -test using GraphPad Prism version 6 software. A repeated-measures one-way ANOVA was used when comparing three or more groups followed by Dunnett's test for multiple comparison. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; NS, not significant).

3.10 Accession Numbers

The accession numbers for the flow cytometry datasets reported in this paper are FlowRepository: FR-FCM-ZYDY, and FlowRepository: FR-FCM-ZYD2 (<https://flowrepository.org>).

3.11 Author Contributions

C.S.-P. designed the study, carried out experiments, analyzed the data, discussed results, and wrote the first draft of the manuscript. E.M., M.B., A.R. and M.-P.H. carried out experiments. L.G. carried out the histological analyses of tissue sections. E.M., M.B., A.R., M.-P.H. and C.P. discussed results. All authors reviewed the manuscript. The authors have no financial conflict of interests.

3.12 Acknowledgements

We are grateful to Gaël Dulude (cell sorting), Micheline Fortin (histology) and Karine Audette (microscopy) for their help and sound advice. The authors also thank Isabelle Caron (thymus transplantations) and the personnel of IRIC animal care facility. This work was supported by grant FDN-148400 from the Canadian Institutes of Health Research. C.S.-P. is supported by a studentship from the Fonds de Recherche Québec-Santé, and C.P. holds a Canada Research Chair in Immunobiology.

3.13 References

Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J.M., et al. (2008). The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* 29, 423–437.

Akunuru, S., and Geiger, H. (2016). Aging, clonality, and rejuvenation of hematopoietic stem cells. *Trends Mol. Med.* 22, 701–712.

Anderson, M.S., Venzani, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., et al. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395–1401.

Atkinson, S.P., Collin, J., Irina, N., Anyfantis, G., Kyung, B.K., Lako, M., and Armstrong, L. (2012). A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 30, 1373–1384.

Basler, M., Kirk, C.J., and Groettrup, M. (2013). The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 74–80.

Vanden Berghe, T., Hulpiau, P., Martens, L., Vandenbroucke, R.E., Van Wonterghem, E., Perry, S.W., Bruggeman, I., Divert, T., Choi, S.M., Vuylsteke, M., et al. (2015). Passenger mutations confound interpretation of all genetically modified congenic mice. *Immunity* 43, 200–209.

Berkers, C.R., van Leeuwen, F.W.B., Groothuis, T.A., Peperzak, V., van Tilburg, E.W., Borst, J., Neefjes, J.J., and Ovaa, H. (2007). Profiling proteasome activity in tissue with fluorescent probes. *Mol. Pharm.* 4, 739–748.

Blais, M.-E., Louis, I., and Perreault, C. (2006). T-cell development: An extrathymic perspective. *Immunol. Rev.* 209, 103–114.

Boehm, T., Hess, I., and Swann, J.B. (2012). Evolution of lymphoid tissues. *Trends Immunol.* 33, 315–321.

Chin, R.K., Lo, J.C., Kim, O., Blink, S.E., Christiansen, P.A., Peterson, P., Wang, Y., Ware, C., and Fu, Y.-X. (2003). Lymphotoxin pathway directs thymic Aire expression. *Nat. Immunol.* *4*, 1121–1127.

Conn, C.S., and Qian, S.-B. (2013). Nutrient signaling in protein homeostasis: an increase in quantity at the expense of quality. *Sci. Signal.* *6*, ra24.

Díaz-Hernández, M., Hernández, F., Martín-Aparicio, E., Gómez-Ramos, P., Morán, M.A., Castaño, J.G., Ferrer, I., Avila, J., and Lucas, J.J. (2003). Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J. Neurosci.* *23*, 11653–11661.

Dooley, J., and Liston, A. (2012). Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *Eur. J. Immunol.* *42*, 1073–1079.

Dumont-Lagacé, M., Brochu, S., St-Pierre, C., and Perreault, C. (2014). Adult thymic epithelium contains nonsenescent label-retaining cells. *J. Immunol.* *192*, 2219–2226.

Eisele, Y.S., Monteiro, C., Fearn, C., Encalada, S.E., Wiseman, R.L., Powers, E.T., and Kelly, J.W. (2015). Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 759–780.

Ferrington, D.A., Hussong, S.A., Roehrich, H., Kapphahn, R.J., Kavanaugh, S.M., Heuss, N.D., and Gregerson, D.S. (2008). Immunoproteasome responds to injury in the retina and brain. *J. Neurochem.* *106*, 158–169.

Gray, D.H., Seach, N., Ueno, T., Milton, M.K., Liston, A., Lew, A.M., Goodnow, C.C., and Boyd, R.L. (2006). Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* *108*, 3777–3785.

Harper, J.W., and Bennett, E.J. (2016). Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance. *Nature* *537*, 328–338.

Hetz, C., Chevet, E., and Oakes, S.A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat. Cell Biol.* *17*, 829–838.

Hewing, B., Ludwig, A., Dan, C., Potzsch, M., Hannemann, C., Petry, A., Lauer, D., Gorlach, A., Kaschina, E., Muller, D.N., et al. (2017) Immunoproteasome subunit $\beta 5i$ /LMP7-deficiency in atherosclerosis. *Sci. Rep.* 7, 13342.

Jain, R., and Gray, D.H. (2014). Isolation of thymic epithelial cells and analysis by flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.* 107, 3.26.1-3.26.15.

Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2015). Proteostasis and aging. *Nat. Med.* 21, 1406–1415.

Kim, M.-J., Miller, C.M., Shadrach, J.L., Wagers, A.J., and Serwold, T. (2015). Young, proliferative thymic epithelial cells engraft and function in aging thymuses. *J. Immunol.* 194, 4784–4795.

Kincaid, E.Z., Che, J.W., York, I., Escobar, H., Reyes-Vargas, E., Delgado, J.C., Welsh, R.M., Karow, M.L., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., et al. (2011). Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat. Immunol.* 13, 129–135.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* 14, 377–391.

Koble, C., and Kyewski, B. (2009). The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J. Exp. Med.* 206, 1505–1513.

Liepe, J., Holzhütter, H.G., Bellavista, E., Kloetzel, P.M., Stumpf, M.P., and Mishto, M. (2015). Quantitative time-resolved analysis reveals intricate, differential regulation of standard- and immuno-proteasomes. *Elife* 4, e07545.

Liston, A., Todd, J.A., and Lagou, V. (2017). Beta-cell fragility as a common underlying risk factor in type 1 and type 2 diabetes. *Trends Mol. Med.* 23, 181–194.

López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217.

Meredith, M., Zemmour, D., Mathis, D., and Benoist, C. (2015). Aire controls gene expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity. *Nat. Immunol.* *16*, 942–949.

Mishto, M., Bellavista, E., Santoro, A., Stolzing, A., Ligorio, C., Nacmias, B., Spazzafumo, L., Chiappelli, M., Licastro, F., Sorbi, S., et al. (2006). Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol. Aging* *27*, 54–66.

Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., and Tanaka, K. (2007). Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* *316*, 1349–1353.

Nil, A., Firat, E., Sobek, V., Eichmann, K., and Niedermann, G. (2004). Expression of housekeeping and immunoproteasome subunit genes is differentially regulated in positively and negatively selecting thymic stroma subsets. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2681–2689.

Papadopoulou, A.S., Dooley, J., Linterman, M.A., Pierson, W., Ucar, O., Kyewski, B., Zuklys, S., Hollander, G.A., Matthys, P., Gray, D.H., et al. (2011). The thymic epithelial microRNA network elevates the threshold for infection-associated thymic involution via miR-29a mediated suppression of the IFN- α receptor. *Nat. Immunol.* *13*, 181–187.

Pérez, V.I., Buffenstein, R., Masamsetti, V., Leonard, S., Salmon, A.B., Mele, J., Andziak, B., Yang, T., Edrey, Y., Friguet, B., et al. (2009). Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 3059–3064.

Pickering, A.M., Lehr, M., and Miller, R.A. (2015). Mouse and primate lifespan is correlated with immunoproteasome expression. *J. Clin. Invest.* *125*, 2059–2068.

Saez, I., and Vilchez, D. (2014). The mechanistic links between proteasome activity, aging and age-related diseases. *Curr. Genomics* *15*, 38–51.

Sansom, S.N., Shikama-Dorn, N., Zhanybekova, S., Nusspaumer, G., Macaulay, I.C., Deadman, M.E., Heger, A., Ponting, C.P., and Holländer, G.A. (2014). Population and

single cell genomics reveal the Aire-dependency, relief from polycomb silencing and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Res.* 24, 1918–1931.

Schmidt, E.K., Clavarino, G., Ceppi, M., and Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat. Methods* 6, 275–277.

Seifert, U., Bialy, L.P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schröter, F., Prozorovski, T., Lange, N., Steffen, J., Rieger, M., et al. (2010). Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 142, 613–624.

St-Pierre, C., Brochu, S., Vanegas, J.R., Dumont-Lagacé, M., Lemieux, S., and Perreault, C. (2013). Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci. Rep.* 3, 1860.

St-Pierre, C., Trofimov, A., Brochu, S., Lemieux, S., and Perreault, C. (2015). Differential features of AIRE-induced and AIRE-independent promiscuous gene expression in thymic epithelial cells. *J. Immunol.* 195, 498–506.

Takaba, H., Morishita, Y., Tomofuji, Y., Danks, L., Nitta, T., Komatsu, N., Kodama, T., and Takayanagi, H. (2015). Fezf2 orchestrates a thymic program of self-antigen expression for immune tolerance. *Cell* 163, 975–987.

Ulyanchenko, S., O'Neill, K.E., Medley, T., Farley, A.M., Vaidya, H.J., Cook, A.M., Blair, N.F., and Blackburn, C.C. (2016). Identification of a bipotent epithelial progenitor population in the adult thymus. *Cell Rep.* 14, 2819–2832.

Ventevogel, M.S., and Sempowski, G.D. (2013). Thymic rejuvenation and aging. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 516–522.

de Verteuil, D.A., Rouette, A., Hardy, M.-P., Lavallée, S., Trofimov, A., Gaucher, E., and Perreault, C. (2014). Immunoproteasomes shape the transcriptome and regulate the function of dendritic cells. *J. Immunol.* 193, 1121–1132.

de Verteuil, D., Muratore-Schroeder, T.L., Granados, D.P., Fortier, M.-H., Hardy, M.-P., Bramoullé, A., Caron, E., Vincent, K., Mader, S., Lemieux, S., et al. (2010). Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on

peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol. Cell. Proteomics* *9*, 2034–2047.

Weih, F., Carrasco, D., Durham, S.K., Barton, D.S., Rizzo, C.A., Ryseck, R.P., Lira, S.A., and Bravo, R. (1995). Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel family. *Cell* *80*, 331–340.

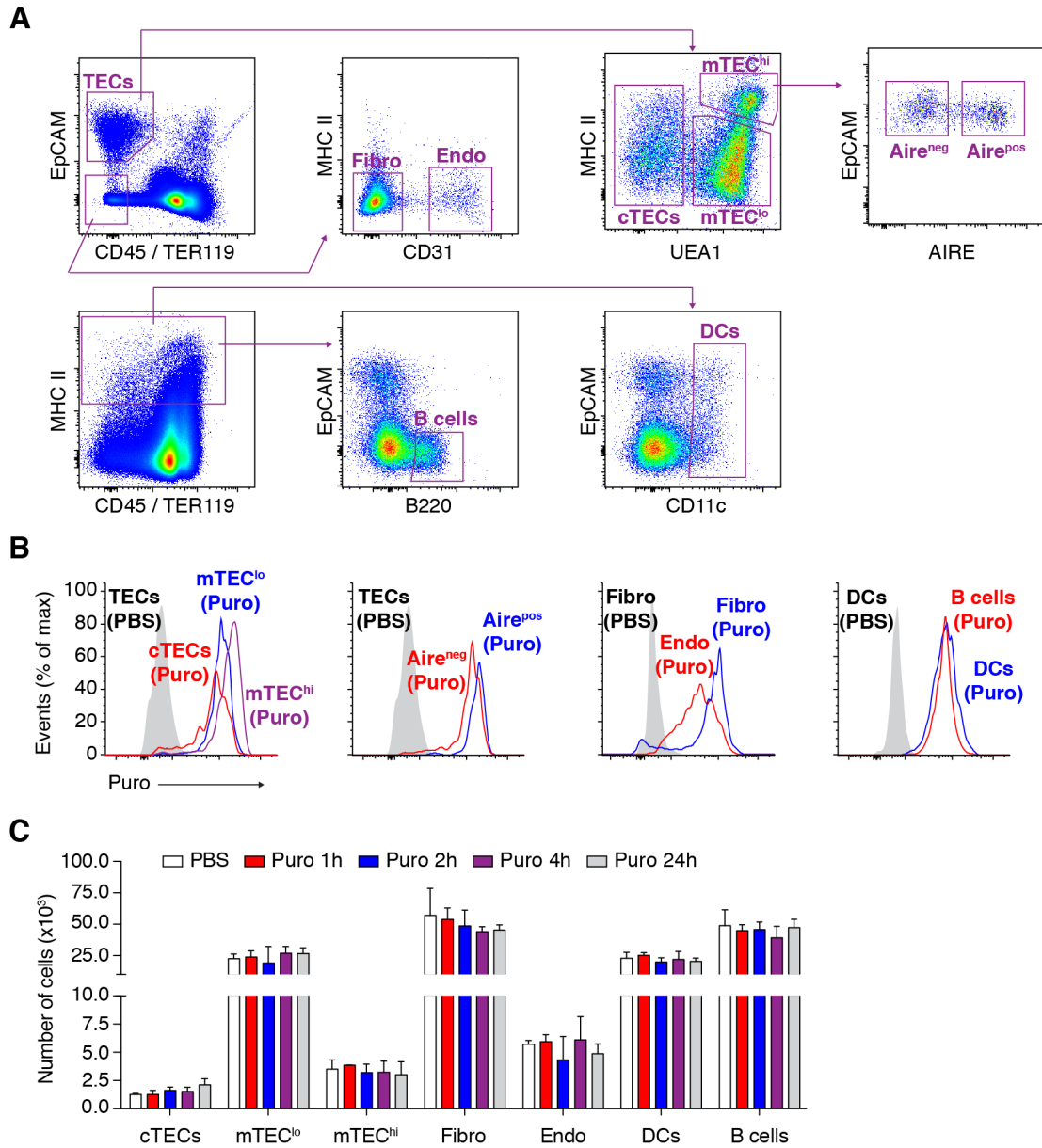
Yewdell, J.W. (2011). DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends Immunol.* *32*, 548–558.

Yun, Y.S., Kim, K.H., Tschida, B., Sachs, Z., Noble-Orcutt, K.E., Moriarity, B.S., Ai, T., Ding, R., Williams, J., Chen, L., et al. (2016). mTORC1 coordinates protein synthesis and immunoproteasome formation via PRAS40 to prevent accumulation of protein stress. *Mol. Cell* *61*, 625–639.

Žuklys, S., Handel, A., Zhanybekova, S., Govani, F., Keller, M., Maio, S., Mayer, C.E., Teh, H.Y., Hafen, K., Gallone, G., et al. (2016). Foxn1 regulates key target genes essential for T cell development in postnatal thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* *17*, 1206–1215.

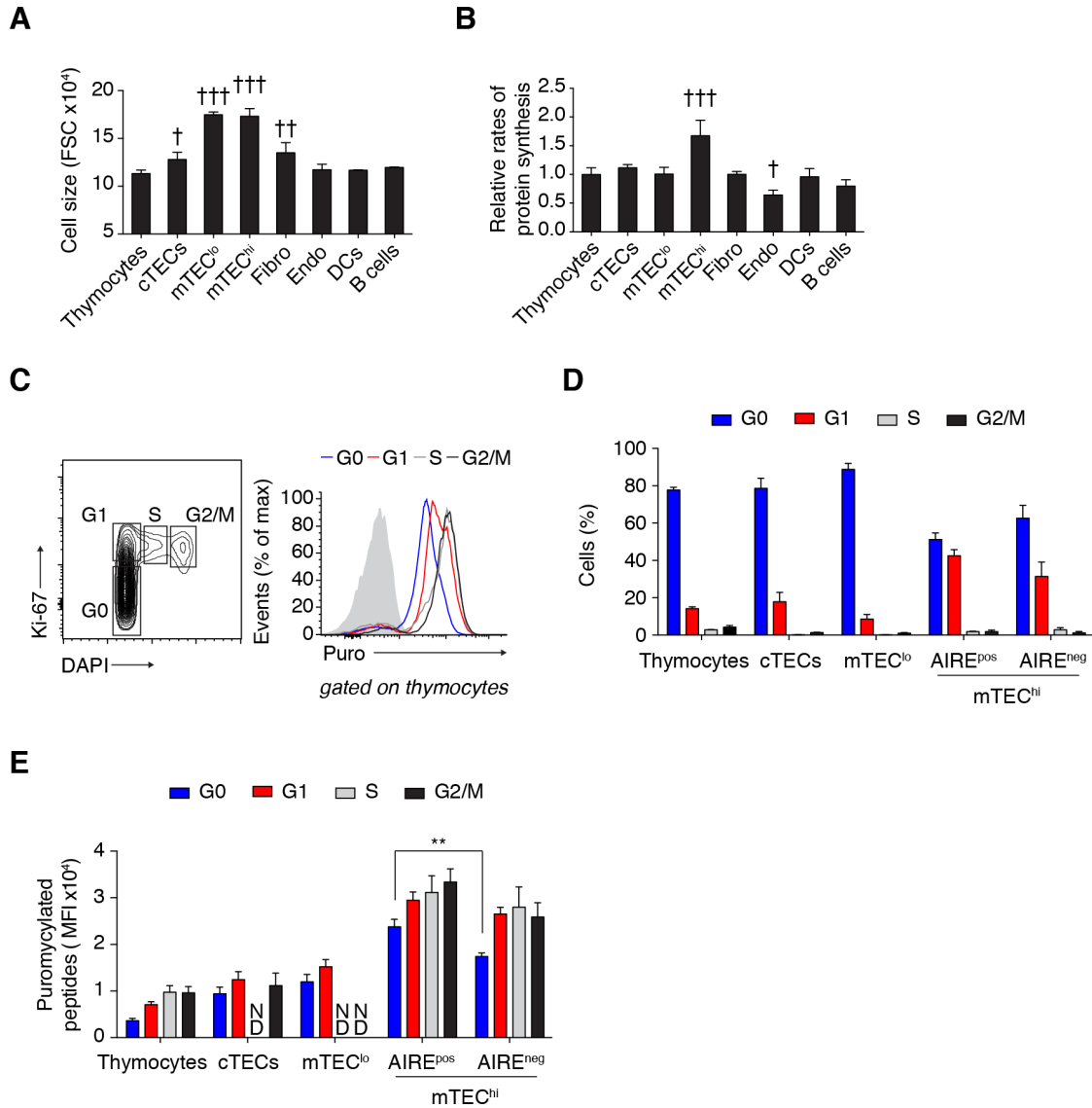
3.14 Supplemental Information

3.14.1 Supplemental Figures



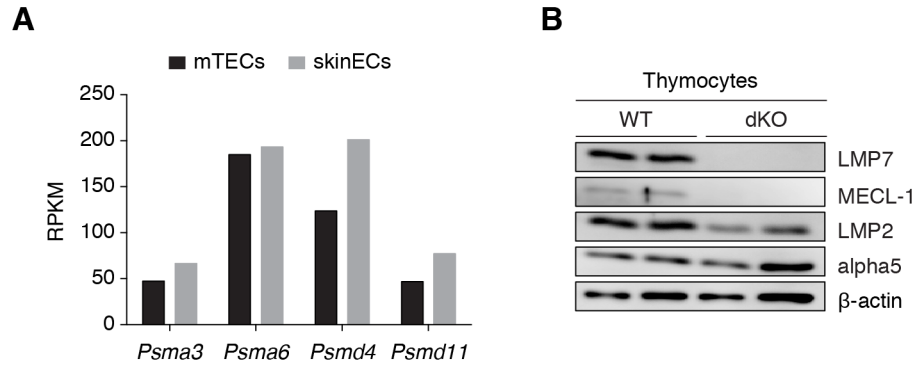
Supplemental Figure 3.S1, related to Figure 3.1 | Analysis of puromycin incorporation in thymic cell populations. (A) Flow cytometry gating strategy for the analysis of thymic cell populations. TECs were defined as 7-AAD⁻CD45⁺TER119⁺EpCAM⁺ and were fractionated in cTECs (UEA1⁻MHCII^{-/lo}), mTEC^{lo} (UEA1⁺MHCII^{lo}) and mTEC^{hi}

(UEA1⁺MHCII^{hi}). mTEC^{hi} were further separated in AIRE-positive and AIRE-negative subsets. Fibroblasts (Fibro) were defined as CD45⁻TER119⁻EpCAM⁻CD31⁻, endothelial cells (Endo): CD45⁻TER119⁻EpCAM⁻CD31⁺, B cells: MHCII^{hi}B220⁺ and dendritic cells (DCs): MHCII^{hi}CD11c⁺. (B) Puromycin (Puro) incorporation in thymic cell populations relative to PBS-injected control mice (gray histograms). (C) Cellularity of thymic cell populations 1, 2, 4 or 24 h after Puro administration as compared to PBS-injected mice (n = 4 mice per timepoint). Data represent mean \pm SD.

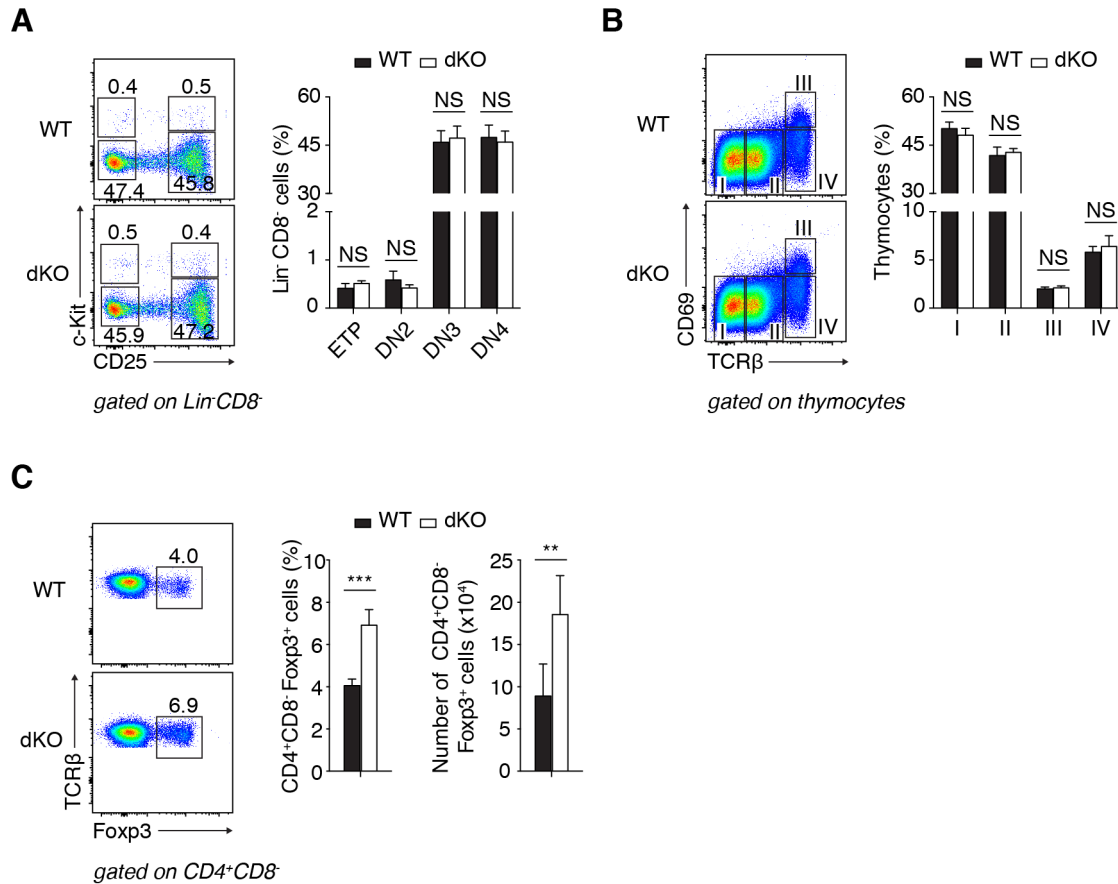


Supplemental Figure 3.S2, related to Figure 3.1 | Influence of cell size and cell cycle status on protein synthesis. (A) Cellular size of thymic cell populations measured with the forward scatter (FSC) parameter. (B) Protein synthesis rates (normalized to cell size) in various thymic cell populations relative to thymocytes in vivo 1 h after puromycin (Puro) administration (n = 17 mice from 4 independent experiments). (C) Flow cytometric analysis of Puro incorporation in distinct phase of the cell cycle (G0, G1, S, G2/M) using Ki-67 and DAPI labelling. (D) Percentage of thymic cell populations in different phase of the cell cycle (n= 3). (E) Puro incorporation in thymic cell populations in different phase of the cell cycle (n = 3 mice). ND, < 1% cells detected. (A, B) Differences relative to thymocytes were assessed using a repeated-measures one-way analysis of variance

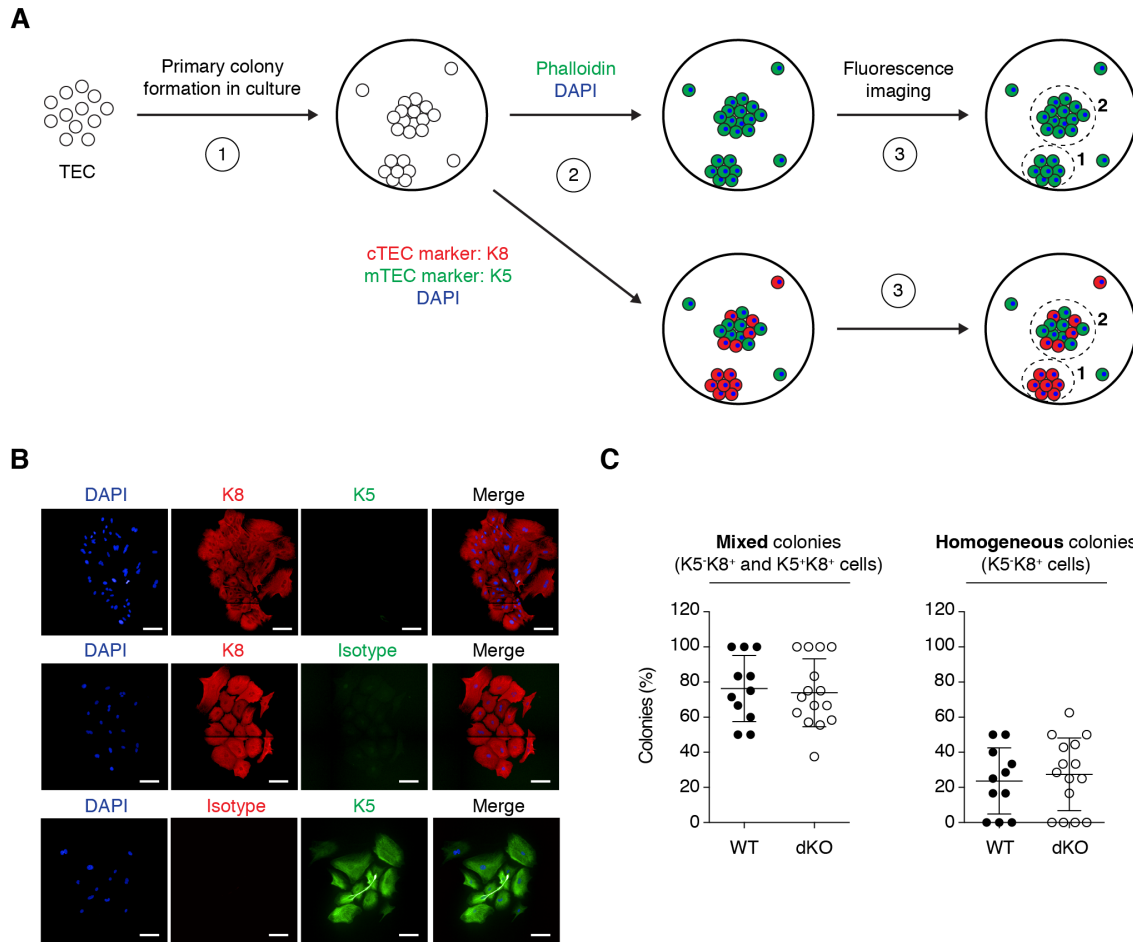
(ANOVA) followed by Dunnett's test for multiple comparison. [†] $P < 0.05$, ^{††} $P < 0.01$, ^{†††} $P < 0.001$. Data represent mean \pm SD.



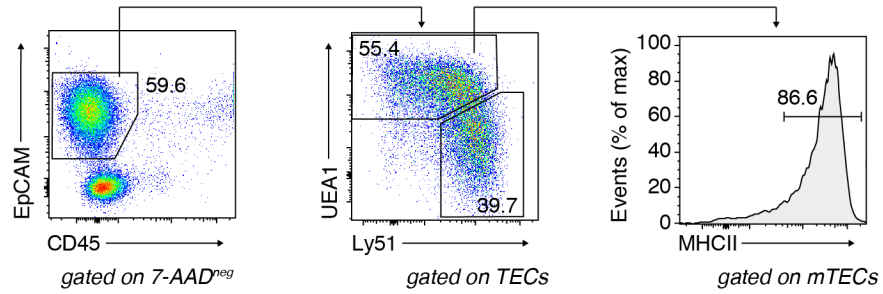
Supplemental Figure 3.S3, related to Figure 3.2 | Expression of proteasome genes in various cell types. (A) Gene expression of core (*PsmA3* (alpha3), *PsmA6* (alpha6)) and regulatory (*PsmD4* (RPN10), *PsmD11* (RPN6)) proteasome subunits in mTECs and skinECs (GSE44945). RPKM, reads per kilobase per million mapped reads. (B) Immunoblot analyses of whole-cell lysates from thymocytes of WT and dKO mice (n = 2). PSMB8 (LMP7), PSMB9 (LMP2), PSMB10 (MECL-1), PSMA5 (alpha5).



Supplemental Figure 3.S4, related to Figure 3.2 | Impact of IP-deficiency on thymocyte development. (A) Flow cytometric analysis of early thymocyte progenitors (ETP) and double-negative (DN) thymocytes in WT and dKO mice. (n = 4-5 mice). (B) Proportion of immature (TCRβ⁻CD69⁻), pre-selected (TCRβ^{lo}CD69⁻), post-selected (TCRβ^{hi}CD69⁺) and mature (TCRβ^{hi}CD69⁻) thymocytes (n = 4-5 mice). (C) Flow cytometric analysis of Foxp3 intracellular staining on gated CD4⁺CD8⁻ cells and percentage and number of CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ cells in WT and dKO mice. Mice were 4 weeks of age. Data represent mean ± SD.



Supplemental Figure 3.S5, related to Figure 3.5 | Colony-forming assay with primary TECs isolated from WT and dKO mice. (A) Schematic representation of TEC colony-forming assays and downstream fluorescence analyses. TEC colonies were stained with fluorescent phalloidin or stained with antibodies against K8 (cTEC marker) and K5 (mTEC marker). All TEC colonies were counterstained with DAPI (nuclei). (B) Phenotypic analysis of TEC colony-derived progeny cells from 2-month old WT mice. Representative images of TEC colonies stained for DAPI (blue), K8 (red), K5 (green) and isotype controls are shown. Scale bar, 100 μ m. (C) Proportion of TEC colonies with a mixed (K5⁻K8⁺ and K5⁺K8⁺ cells) or homogeneous (K5⁻K8⁺ cells) phenotype in WT and dKO mice (n = 11-15 replicate wells per genotype, 3 independent experiments). Data represent mean \pm SD.



Supplemental Figure 3.S6, related to Figure 3.6 | Phenotypic evaluation of TEC subsets in fetal thymic organ culture. FACS profiles show the strategy for the gating of cTECs and mTECs. MHCII expression on gated mTECs is also shown.

3.14.2 Supplemental Experimental Procedures

3.14.2.1 Mice

C57BL/6, B6.129S2-Aire^{tm1.1Doi}/J, B6.Cg-Foxn1nu/J (nude) and B6.Tg(CAG-EGFP)131Osb/LeySopJ mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor). *Psm8*^{-/-}*Psm10*^{-/-} (dKO) mice were generously provided by Dr. T.A. Griffin from the Medicine College of the University of Cincinnati.

3.14.2.2 Flow cytometry and cell sorting

Thymic cells were stained with biotinylated Ulex Europaeus Lectin 1 (UEA1; Vector Laboratories), PE-Cy7 conjugated streptavidin (BD Biosciences) and the following antibodies (Abs): Alexa Fluor 700 anti-CD45, PE anti-I-A^b, FITC anti-CD80, PerCP anti-CD45R/B220, PerCP-Cy5.5 anti-CD11c (BD Biosciences), APC-Cy7 anti-EpCAM, Alexa Fluor 647 anti-Ly51, Alexa Fluor 488 anti-CD31, Alexa Fluor 700 anti-TER119 (Bio Legend). Cell viability was assessed using 7-amino-actinomycin D (7-AAD) and apoptosis using FITC anti-Annexin V following the manufacturer's instructions (BD Biosciences). For intracellular staining, cell viability was assessed using the Fixable Blue Dead Cell Stain Kit (Life Technologies) and cells were fixed / permeabilized using the Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) and stained with Alexa Fluor 488 anti-AIRE (eBioscience), PE anti-Ki67 (BD Biosciences), Alexa Fluor 488 anti-phospho-S6 (Ser235/236), Alexa Fluor 647 anti-S6 (Cell Signaling), anti-phospho (Ser51)-EIF2S1 (Abcam), anti-PSMA6 (Novus Biologicals) and 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Life Technologies). Thymocytes were stained with the following Abs: Alexa Fluor 700 anti-CD4, BUV395 anti-CD8a, APC-eFluor 780 anti-cKit, APC anti-CD25, APC anti-TCR β , PE-Cy7 anti-CD69, PE anti-Foxp3 (BD Biosciences). For analysis of double negative thymocyte subsets, cells were stained with the following lineage (Lin) cocktail: biotinylated B220, Ter119, Ly6g, CD3, CD11b, TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$, CD11c, NK1.1 and PE-Cy7 conjugated streptavidin (BD Biosciences). Cells were sorted to >95% purity on a three-laser FACS Aria (BD Biosciences) or analyzed on a three-laser LSR II (BD Biosciences) with BD FACSDiva and FlowJo softwares (Tree Star). For all multicolor flow cytometry analyses, at least

100,000 events per single-stained sample were recorded to adjust compensation for spectral overlap. Isotype controls were used as negative controls.

3.14.2.3 Measurement of protein synthesis

For in vitro analysis, 3×10^7 thymic cells were resuspended in 100 μ l of RPMI-1640 medium supplemented with 1 mM L-glutamine and 25 mM HEPES (Life Technologies). Puromycin (SIGMA; 10 μ g/ml final concentration) was added to the culture medium for 1 h and cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS). Cells were fixed / permeabilized using the Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) and stained with Alexa Fluor 647 anti-puromycin Ab (EMD Millipore). To inhibit puromycin incorporation, cycloheximide (SIGMA) was added 1 h before puromycin at a final concentration of 100 μ M. All cultures were incubated at 37°C in 5.0% CO₂. Relative rates of protein synthesis were calculated by normalizing puromycin fluorescence signals after subtracting autofluorescence background.

3.14.2.4 Immunoblotting analyses

Thymocyte whole-cell lysates were prepared and immunoblotted as previously described (de Verteuil et al., 2010). Abs against PSMB8, PSMB9, PSMB10, PSMA5 were purchased from Abcam and β -actin from Sigma.

3.14.2.5 Bone marrow chimeras

8-week old recipients were lethally irradiated (1000 cGy) and reconstituted within 24 h with donor bone marrow cells. Bone marrow was harvested from tibias and femurs of 10-week old WT and dKO donor mice, then dissociated into single-cell suspensions. Bone marrow cells were T-cell depleted by using anti-Thy1.2 monoclonal antibody and low-toxicity rabbit complement (Cedarlane). Irradiated recipients received 10^7 donor-derived bone marrow cells via tail vein injection. Thymi were analyzed 6 weeks after reconstitution.

3.14.2.6 Histological analyses

Tissues were fixed immediately after dissection in 10% formalin for 24 h, embedded in paraffin and cut in 4- μ m sections and stained for hematoxylin and eosin. For morphometric analyses, the medullary and cortical areas of thymic cross-sections were quantified using the NDP.view software version 2.0 (6 sections per thymus were analyzed). Perivascular and interstitial inflammatory cell infiltration were also visualized using the NDP.view software.

3.14.2.7 Blood and urine analyses

Clinical chemistry analysis of blood and urine samples was performed by Charles River Laboratories (Senneville, QC, Canada).

3.14.2.8 RNA extraction

Total RNA was isolated using TRIzol as recommended by the manufacturer (Invitrogen) and then further purified using RNeasy Micro columns (Qiagen). Sample quality control, reverse transcription and gene expression analysis was performed as described previously (Dumont-Lagacé et al., 2014).

3.14.2.9 qPCR primers

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
<i>Ins2</i>	GAAGTGGAGGACCCACAAGT	AGTGCCAAGGTCTGAAGGTC
<i>SpiB</i>	AGAGGACTTCACCAGCCAGA	GGGCTGTCCAGCATAATGTC
<i>Tnfrsf11a</i>	GGAGCTCAGCATCCCTTG	TCTGTGGACGAAAAGACATCTG
<i>Cd40</i>	CCATGTGACTCAGGCGAAT	TAACCCGAAGCCCTTGATT
<i>Spt1</i>	TGCTCTTCTACTTGTCACCATGA	TGTTTGTCTCCGGGTCCT
<i>S100a8</i>	TCCTTGCGATGGTGATAAAA	GGCCAGAAGCTCTGCTACTC
<i>Gad1</i>	AAGATGATGGGCGTGCTG	TCTGGTTGCATCCTTGAGT
<i>Crp</i>	GCTTCTCTCGGACTTTTGGTC	GGTGTTCACTGGCTTCTTTGA
<i>Csn2</i>	TCCGTTTCTGTCTAAGAGGATTTC	CATTTCAGTTTCAGTCAGTTCA
<i>Traf6</i>	CCAGGTAAATACACACATTATTGAGG	GACAGCTTTGATCATGGATCTCT
<i>Map3k14</i>	GCCTAGGGAAATCCTTGCTC	GGCTTTCCCATCACCCTT
<i>Relb</i>	CTGGGAATTGACCCCTACAA	CTGCTGGTCCCGATAGGAG
<i>Tnfrsf11b</i>	GTTTCCCGAGGACCACAAT	CCATTCAATGATGTCCAGGAG
<i>Ltbr</i>	GCTCCAGGTACCTCCTACTCG	ATGGCCAGCAGTAGCATTG
<i>Fezf2</i>	GCAAAGGCTTTCACCAAAAA	GCATGTGGAAGGTCAGATTG
<i>Aire</i>	GTGGCCTCTGGGGATGTT	GCACTTCTTGATCTTCCTGA
<i>Hspa5</i>	CTGAGGCGTATTTGGGAAAG	CAGCATCTTTGGTTGCTTGTC
<i>Ddit3</i>	CACGTCGATTATATCATGTTGAAGA	GCACTTCCTTCTGGAACACTCT
<i>Xbp1</i>	TGACGAGGTTCCAGAGGTG	TGTTCTGGGGAGGTGACAAC
<i>sXbp1</i>	CTGAGTCCGCAGCAGGT	TGAAGAGGCAACAGTGTGAGA
<i>Dnajb9</i>	CACAAAGATGCCTTTTCTACCG	TTAAACTTTTCAGCTTAATGACGTG
<i>Dnajc3</i>	AAGAAGTCCTCTCAGACCCAGA	TCCAACCTCGGTGGAAGG
<i>Pdia3</i>	GTGGCCACTGTAAGAATCTGG	TGACAATATTTGGATCTTTGCTG
<i>Atf4</i>	TCAGACACCGGCAAGGAG	TCATCCAACGTGGTCAAGAG
<i>Edem1</i>	GGTCTTCGAAGCTACGATAAGG	GGGCTGTTTGGAATCAGTTATTA

<i>Hsp90b1</i>	AGGGTCCTGTGGGTGTTG	CATCATCAGCTCTGACGAACC
<i>Bad</i>	GGAGCAACATTCATCAGCAG	TACGAACTGTGGCGACTCC
<i>Bax</i>	GTGAGCGGCTGCTTGTCT	GGTCCCGAAGTAGGAGAGGA
<i>Bak1</i>	CCACATCTGGAGCAGAGTCA	TGTCCAGATGCCATTTTCA
<i>Hsfl</i>	CTGTGGACCCTCGTGAGC	GGAAGCTGTTCCCACTCG
<i>Gapdh</i>	TGTCCGTCGTGGATCTGAC	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
<i>Hprt</i>	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC

3.14.2.10 Proteasome content

Global proteasome content was assessed using the Me4BodipyFL-Ahx₃Leu₃VS probe (proteasome-BODIPY) from Boston Biochem (catalog no. I-190). Cells were incubated in the presence of proteasome-BODIPY for 1 h in RPMI-1640 according to manufacturer's recommendations.

3.14.2.11 TEC colony-forming assay

Colony-forming assays were performed as previously described (Kim et al., 2015) but in the absence of irradiated feeder cells. TEC colonies were cultured in Greiner 96-well plates (SIGMA) at 37°C, 5% CO₂ and TEC media was changed every 2 days. For detection and phenotypic analysis, only defined spheroid colonies containing at least 5 cells were considered. For colony staining, cultured TECs were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, washed in PBS and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 30 min. Colonies were stained with Alexa Fluor 488-conjugated Phalloidin (ThermoFisher Scientific), purified anti-Keratin 5 (Bio Legend), anti-Keratin 8 (TROMA-I; DSHB) and 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Life Technologies). After washing, colonies were stained with Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-rat IgG and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (Life Technologies). Fluorescence image acquisitions of TEC colonies were performed using an Operetta microscope (Perkin Elmer). Cells were considered K5-positive only when the K5 fluorescence intensity was 3-fold higher than the autofluorescence background for the matching isotype control.

3.14.2.12 Fetal thymic organ cultures

For depletion of thymocytes, thymic lobes were cultured for 5 days with 1.35 mM 2'-deoxyguanosine (SIGMA). Thymic lobes were further cultured for 4 hours in presence of 5 µg/ml tunicamycin (SIGMA) and were disaggregated with 0.1 % DNase I (SIGMA) and 0.01% Liberase (Roche) prior to flow cytometry analysis.

3.14.2.13 Thymus transplantations

Thymic lobes from 2-day old WT and dKO mice were cultured for 5 days with 1.35 mM 2'-deoxyguanosine (SIGMA) to deplete lymphoid cells. A small dorsolateral incision was made to expose the right kidney, and a small hole was cut in the kidney capsule of anesthetized 8-week old nude recipient mice. Neonatal thymic lobes (1 per mouse) were surgically transferred under the kidney capsule of nude mice, which was then closed with non-toxic surgical glue. The transplanted kidney was put back in the abdomen, the muscle layer sutured and the skin closed using one or two wound clips. Thymic transplants were analyzed 8 and 16 weeks after surgery by flow cytometry or histology. Reconstitution of T cells was confirmed by the presence of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleen of transplanted nude mice.

3.14.3 Supplemental References

Dumont-Lagacé, M., Brochu, S., St-Pierre, C., and Perreault, C. (2014) Adult thymic epithelium contains nonsenescent label-retaining cells. *J. Immunol.* *192*, 2219-2226.

Kim, M.-J., Miller, C.M., Shadrach, J.L., Wagers, A.J., and Serwold, T. (2015) Young, proliferative thymic epithelial cells engraft and function in aging thymuses. *J. Immunol.* *194*, 4784-4795.

De Verteuil, D., Muratore-Schroeder, T.L., Granados, D.P., Fortier, M.-H., Hardy, M.-P., Bramoullé, A., Caron, E., Vincent, K., Mader, S., Lemieux, S., et al. (2010) Depletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol. Cell. Proteomics* *9*, 2034-2047.

CHAPITRE 4

4. Discussion

L'objectif général de cette thèse était d'augmenter notre compréhension de l'involution thymique, dont les mécanismes pathophysiologiques demeurent mal compris. En effet, les facteurs actuellement reconnus pour contrôler la cellularité et la fonction thymique sont insuffisants pour expliquer pourquoi le thymus est l'organe de l'organisme qui vieillit le plus rapidement. Or, nos travaux de recherche proposent un nouveau mécanisme à l'involution thymique avec un grand pouvoir explicatif. Nous avons démontré que l'EGP, le mécanisme utilisé par les mTECs pour établir la tolérance au soi, représente une source de stress importante qui impose à ces cellules un vieillissement accéléré.

D'une part, en raison de l'EGP, les mTECs expriment un large éventail de gènes ectopiques en plus de leur programme transcriptionnel de base⁹⁰. De plus, les résultats obtenus démontrent que l'induction de la tolérance au soi par les mTECs représente un fardeau majeur pour le maintien de la protéostasie et que ce stress protéotoxique est atténué par l'expression constitutive de l'IP, qui agit comme un régulateur majeur de l'homéostasie des mTECs²³⁷.

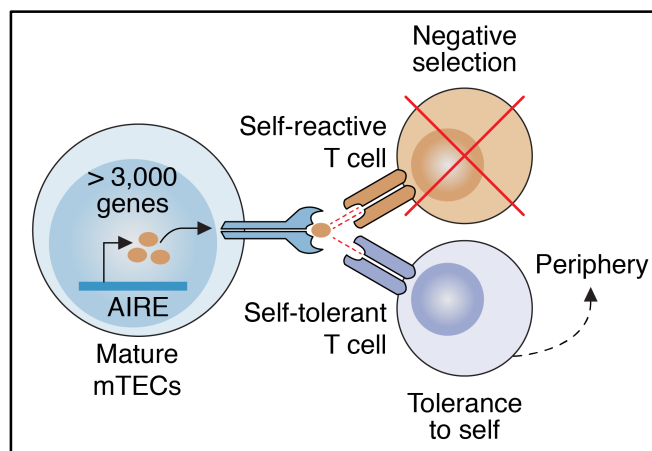
Les mTECs représentent l'élément central du nouveau modèle que nous proposons pour expliquer l'involution thymique^{42,264}. Nous discuterons donc comment les mécanismes moléculaires et cellulaires contrôlant l'homéostasie des mTECs ont un impact direct sur la fonction du thymus. Toujours dans le contexte de la biologie des mTECs, cette discussion sera divisée en trois sections qui porteront sur les trois objectifs spécifiques de cette thèse.

4.1 Impact de l'EGP au niveau transcriptionnel

4.1.1 Les mTEC matures ont un dosage génique augmenté

En plus d'induire la transcription de nombreux antigènes du soi pour induire la tolérance centrale¹⁰⁵, AIRE agit à plusieurs niveaux sur la biologie des mTECs. Notamment, AIRE contrôle le développement des mTECs, augmente la présentation antigénique aux thymocytes et assure le transfert unidirectionnel d'antigènes aux DCs thymiques^{115,265,266}. Nous avons observé que chez les souris *Aire*-KO adultes, le nombre de mTEC matures est trois fois plus élevé que chez les contrôles sauvages (Figure 2.1B et Supplemental Figure 2.S2). En accord avec le fait que AIRE n'est pas exprimé chez les mTEC immatures, l'absence de AIRE n'a aucun effet sur la taille de ce compartiment cellulaire. Ainsi, l'expression de AIRE dans les mTEC matures limite le nombre absolu de ces cellules. Deux explications non-mutuellement exclusives pourraient expliquer ce phénotype. Premièrement, plusieurs évidences suggèrent qu'en interagissant avec plusieurs médiateurs pro-apoptotiques, AIRE induit l'apoptose chez les mTECs²⁶⁷⁻²⁷⁰. Cette mort cellulaire programmée permettrait notamment à d'autres cellules présentatrices d'antigènes de phagocyter et de présenter de manière croisée les antigènes produits par les mTECs²⁶⁷⁻²⁷⁰. Aussi, comme nous l'avons mis en évidence, le programme d'EGP induit par AIRE représente une source de stress importante pouvant mener à l'apoptose des mTECs.

Figure 4.1 : AIRE contrôle l'expression de plus de 3,000 gènes promiscuitaires chez les mTEC matures. En induisant la transcription de nombreux gènes codant pour des antigènes du soi, AIRE permet l'élimination des thymocytes auto-réactifs via la



sélection négative. À l'opposé, les thymocytes tolérants au soi quittent vers la périphérie. Adapté et reproduit avec la permission de *Nature Publishing Group* (Anderson et Su¹²¹).

Au total, nous avons observé que les mTEC matures AIRE-positives expriment beaucoup plus de gènes que les autres populations de TECs (Supplemental Figure 2.S3B, C). Or, nous avons découvert que AIRE contrôle de manière intrinsèque les niveaux d'activation d'un peu plus de 3,000 de ces gènes, ce qui représente environ 14% des gènes codants pour des protéines (Figure 2.4A et Figure 4.1). C'est donc dire qu'en plus des gènes exprimés de façon ubiquitaire et des gènes spécifiques au programme transcriptionnel des mTECs, ces cellules expriment une multitude de gènes ectopiques normalement retrouvés dans d'autres types cellulaires.

Or, une augmentation aussi drastique du dosage génique est associée à des risques importants. Par exemple, chez les cellules aneuploïdes, les fluctuations dans les degrés d'activation des gènes modifient la stœchiométrie au niveau de différents complexes de protéines. Ce débalancement du protéome mène à l'apparition de stress protéotoxique, caractérisé par une surabondance de protéines mal-repliées ou défectueuses²⁷¹⁻²⁷⁴. Aussi, l'expression de plusieurs centaines de gènes ectopiques additionnels représente un défi majeur pour le maintien de l'identité cellulaire²⁷⁵. En effet, des gènes AIRE-dépendants pourraient coder pour des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation de d'autres types cellulaires. Toutefois, les mécanismes précis permettant aux mTEC matures exprimant AIRE de maintenir leur identité cellulaire demeurent inconnus. Or, les mTECs individuelle n'expriment pas la totalité des gènes issus de l'EGP. Ces cellules se divisent plutôt la tâche en exprimant chacune de petits groupes de co-expression composés de quelques centaines de gènes⁹⁶⁻⁹⁸. Ce mécanisme pourrait donc potentiellement protéger l'identité cellulaire des mTECs. Alternativement, nous émettons l'hypothèse que la majorité des protéines produites à partir de gènes promiscuitaires ont une courte demi-vie et sont rapidement dégradées en peptides antigéniques qui sont préférentiellement présentés à la surface des mTECs^{276,277}.

4.1.2 Les mTECs sont le miroir du soi immunitaire

L'EGP augmente considérablement la représentation du soi immunitaire dans le thymus. Cette propriété distinctive des mTECs leur permet d'exprimer une plus grande diversité de gènes afin de représenter virtuellement tous les tissus et organes de l'organisme au sein du thymus. En considérant tous les gènes tissu-spécifiques exprimés par les mTEC matures, nous avons observé que plus de 50 tissus sont représentés dans le thymus afin d'induire la tolérance au soi (Figure 2.5A). Par exemple, plusieurs de ces gènes codent pour des enzymes digestives pancréatiques ou d'autres protéines jouant des fonctions tissu-spécifiques dans l'estomac, le foie et l'intestin (Figure 2.5A). Aussi, nous avons découvert qu'en plus d'avoir une signature transcriptionnelle extrêmement diversifiée, les mTEC matures expriment une grande variété d'isoformes issues de l'épissage alternatif (Supplemental Figure 2.S3D, E). En effet, comparativement aux autres sous-populations de TECs, les mTEC matures montrent un plus haut degré d'épissage alternatif. De plus, en accord avec l'identification de protéines impliquées dans la maturation des pré-ARN messenger et des composantes du spliceosome comme partenaires d'interaction à la protéine AIRE¹¹², nous avons observé que AIRE était en grande partie responsable de ce haut degré d'épissage alternatif. Afin d'établir la tolérance au soi, les mTECs doivent présenter à leur surface un répertoire diversifié de peptides qui reflète le plus fidèlement possible les peptides que rencontreront les lymphocytes T en périphérie²⁷⁸. Or, en exprimant une variété d'isoformes tissu-spécifiques, ce mécanisme permet également aux mTECs d'augmenter la couverture du soi immunologique dans le thymus.

Bien que les mTECs possèdent des mécanismes pour augmenter la diversité des transcrits, le protéome n'est pas le portrait exact du transcriptome²⁷⁹⁻²⁸³. De plus, ce ne sont pas tous les gènes exprimés qui génèrent des peptides pour la présentation antigénique²⁸⁴. En effet, l'immunopeptidome présente seulement une fraction du génome codant pour des protéines, car les peptides du CMH I sont préférentiellement sélectionnés à partir d'un répertoire limité de protéines²⁸⁴. Or, les analyses au niveau protéomique sont le seul moyen de déterminer la nature des peptides du soi produits et présentés par les mTECs. Afin de mieux comprendre les règles gouvernant la biogenèse des peptides du soi présentés par les mTECs, il sera capital dans un premier temps, de définir la fraction des gènes

promiscuitaires qui sont traduits en protéines chez ces cellules. Des approches de profilage des ribosomes pourraient alors être envisagées afin d'obtenir un aperçu instantané des ARN messagers en cours de traduction par les ribosomes²⁸⁵. Finalement, afin d'établir si des trous noirs existent véritablement dans l'établissement de la tolérance au soi, des analyses de spectrométrie de masse devront être effectuées sur les peptides présentés par les mTECs^{17,19,284,286–288}. Bien que ces analyses soient conceptuellement pertinentes, elles sont actuellement limitées par la faible quantité de matériel biologique pouvant être extraite chez la souris (i. e., quelques dizaines de milliers de mTECs par souris peuvent typiquement être isolés). Ces études dépendront donc des progrès dans l'isolation prospective d'une plus grande quantité de ces cellules in vivo ou du développement de méthodes d'expansion plus efficaces in vitro. Aussi, ces analyses pourraient être transposées chez l'humain, chez qui un nombre plus grand de mTECs peut être isolé. En effet, des fragments de thymus peuvent être obtenus chez des enfants en très bas âge qui subissent une thymectomie (ablation du thymus) dans le contexte d'une chirurgie cardiothoracique visant à corriger des défauts congénitaux de la fonction cardiaque^{289–291}.

4.1.3 Fonctions alternatives de l'EGP

L'analyse du transcriptome des mTEC matures a révélé que l'EGP pourrait avoir plusieurs fonctions distinctes (Figure 2.6). D'une part, les gènes promiscuitaires AIRE-dépendants sont enrichis en gènes tissu-spécifiques qui ne servent aucune fonction dans les mTECs autres que d'être une source d'antigènes du soi. De plus, le rôle de l'EGP n'est pas restreint à la production d'antigènes, car plusieurs de ces gènes promiscuitaires pourraient jouer des fonctions décisives dans la biologie des mTECs (Figure 2.6). Notamment, nous avons observé que plusieurs gènes ectopiques AIRE-dépendants pourraient être impliqués dans des interactions homotypiques de type cellule-cellule entre mTECs, ce qui permettrait d'assurer leur distribution dans la médulla thymique. De plus, certains gènes promiscuitaires pourraient augmenter la capacité de présentation antigénique des mTECs. Par exemple, nous avons découvert que AIRE contrôle la production de signaux sécrétés dans le microenvironnement thymique pour contrôler la migration des thymocytes. Les interactions entre mTECs et thymocytes sont sans doute également augmentées via l'expression de plusieurs molécules d'adhésion et de facteurs de co-stimulation impliqués dans des interactions cellule-cellule hétérotypiques. Or, cela pourrait permettre aux thymocytes de prolonger leur interaction avec les mTECs pour s'assurer de voir tous les antigènes du soi présentés dans la médulla thymique. La protéolyse est un autre processus biologique associé à l'EGP et l'expression promiscuitaire d'une variété d'enzymes protéolytiques pourraient permettre aux mTECs d'être plus efficaces dans la production d'antigènes du soi.

4.2 Impact de l'EGP au niveau traductionnel

4.2.1 Les mTEC matures synthétisent plus de protéines

Les mTEC matures ont un dosage génique augmenté qui leur permet d'exprimer une grande diversité de transcrits. Au cours des dernières années, les travaux de plusieurs laboratoires, incluant le nôtre, ont permis de bien caractériser ce phénomène au niveau transcriptionnel. Toutefois, aucune étude n'a été faite sur l'impact de l'EGP au niveau traductionnel. Or, nous avons découvert qu'en raison de l'EGP, les mTEC matures ont également un niveau d'ARN total augmenté et un taux de transcription globale ~50% plus élevé que les autres populations de TECs (résultats non-publiés). De plus, les mTEC matures sont sans équivoque les cellules qui synthétisent le plus de protéines dans le thymus (Figure 3.1B). Nous avons démontré que le taux élevé de synthèse protéique global des mTEC matures est indépendant de la taille cellulaire, du cycle cellulaire et est en partie contrôlé par AIRE. Le fait saillant de nos analyses est donc que les taux de synthèse protéique des mTECs corrélerent avec l'étendue d'EGP dans ces cellules. La découverte d'une activité traductionnelle très élevée chez les mTEC matures a soulevé une question fondamentale pour la suite de nos travaux de recherche : comment font ces cellules pour maintenir la protéostasie afin d'éviter l'apparition de stress protéotoxique? Or, les mTEC matures ne sont pas la seule population cellulaire dont les taux de synthèse protéique sont très élevés. C'est notamment le cas des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas qui synthétisent une grande quantité d'insuline en réponse aux fluctuations de glucose et qui s'exposent ainsi à un stress protéotoxique en condition physiologique^{292,293}. Afin de tolérer ce stress, ces cellules activent de façon constitutive la réponse UPR, la réponse biochimique principale permettant de maintenir la protéostasie²⁹⁴⁻²⁹⁷. Les plasmocytes sont un autre type cellulaire avec un métabolisme des protéines intrinsèque augmenté. Afin de préparer la capacité du réticulum endoplasmique à la production massive d'anticorps, les plasmocytes activent la voie IRE1 α de la réponse UPR, qui est elle-même requise pendant leur processus de différenciation^{298,299}. À l'instar de ces cellules, il demeure inconnu si la majorité de la production de protéines est destinée à la sécrétion extracellulaire chez les mTEC matures. Néanmoins, nos travaux ont permis l'identification d'un régulateur important avec un rôle insoupçonné dans la régulation de la protéostasie chez les mTEC matures.

4.2.2 Régulation de la protéostasie chez les mTECs

Une régulation minutieuse de la protéostasie est requise pour maintenir la fonction et la viabilité cellulaire²⁴⁶. En effet, la composition du protéome doit être continuellement ajusté selon les conditions métaboliques ou environnementales qu'expérimentent les cellules ou tissus de l'organisme²⁴⁴. Pour maintenir l'intégrité et la qualité du protéome, la cellule utilise des réseaux biochimiques qui assurent une surveillance des protéines tout au long de leur cycle de vie, c'est-à-dire à partir de leur synthèse jusqu'à leur élimination²⁴⁴.

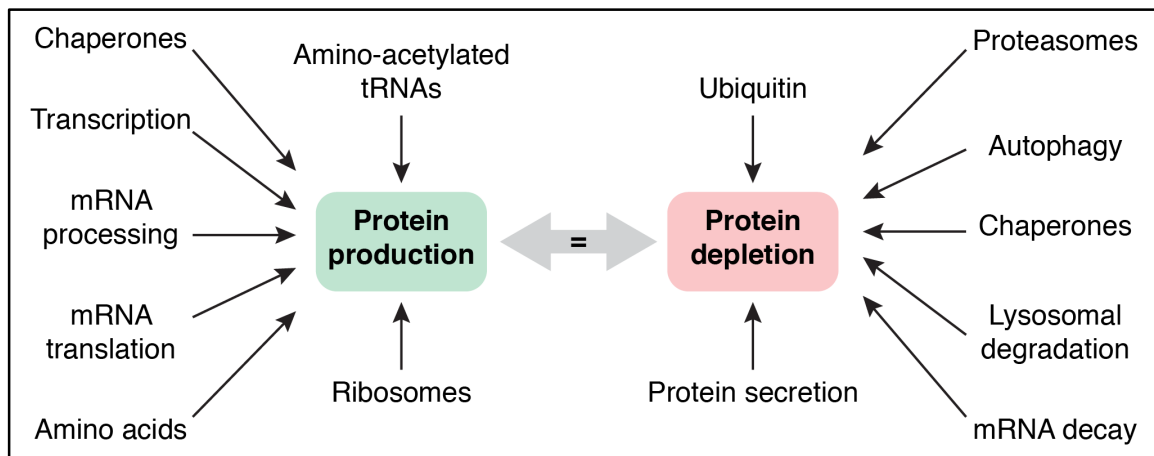


Figure 4.2 | Mécanismes contrôlant la qualité du protéome. Lorsque le protéome est à l'état d'équilibre, le taux de production de protéines (vert) n'excèdent pas la capacité des systèmes de déplétion de protéines (rouge). Pour maintenir cet équilibre, plusieurs facteurs contribuent à la biogenèse et à la dégradation des protéines. Plusieurs événements cellulaires ou états métaboliques tels qu'un déséquilibre des chromosomes, une activation oncogénique et des erreurs dans la traduction des protéines peuvent altérer le protéome et causer l'apparition de stress protéotoxique. Ce stress peut être modéré par une capacité augmentée de dégradation des protéines ou amplifié par la déplétion de facteurs facilitant le repliement ou la dégradation des protéines. Adapté et reproduit avec la permission de *Nature Publishing Group* (Harper et Bennett²⁴⁴).

Nous avons montré que les mTEC matures possèdent plusieurs caractéristiques qui peuvent induire un déséquilibre dans le protéome (Figure 4.2). En raison de l'EGP, les mTEC matures ont une activité transcriptionnelle augmentée, un traitement des ARN messager très efficace et une activité traductionnelle considérablement élevée. De plus l'augmentation de la production de protéines chez les mTEC matures est corrélée avec une activation augmentée du complexe mTORC1, un régulateur central des taux de synthèse protéique (Figure 3.1E).

Nous nous sommes particulièrement intéressé aux mécanismes impliqués dans la déplétion des protéines qui permettraient de compenser à la production augmentée de protéines chez les mTEC matures. Notamment, nous avons observé que comparativement aux mTEC immatures, les mTEC matures ont une activation augmentée de deux voies importantes de la réponse UPR (PERK, IRE1 α) (Figure 3.1E). Cela permet notamment aux mTEC matures de sur-exprimer des chaperones qui augmentent la capacité à replier des protéines (Figure 4.2). Toutefois, nous ignorons si ce mécanisme adaptatif permet aux mTEC matures de mieux tolérer le stress protéotoxique induit par l'EGP en condition physiologique. À l'instar des plasmocytes qui doivent activer la réponse UPR afin de se différencier^{298,299}, il demeure inconnu si l'activation constitutive d'une ou plusieurs voies de la réponse UPR contrôle également la différenciation des mTECs. Des études additionnelles seront donc requises afin de déterminer si ces facteurs de contrôle du stress protéotoxique sont impliqués dans le maintien homéostatique des mTEC matures *in vivo*.

Le degré de stress protéotoxique peut être contrôlé via l'expression cellule-spécifique de différents régulateurs de la protéostasie^{240,300}. Or, les mTECs expriment une variété d'enzymes lysosomiales impliqués dans la production de peptides antigéniques pour l'établissement de la tolérance au soi⁷². Ces enzymes dégradent les protéines acheminées par macroautophagie, un processus de séquestration de constituants cellulaires qui ciblent une variété de protéines aux lysosomes⁷². Cependant, bien que l'autophagie soit importante pour la production de peptides antigéniques par les mTECs, il demeure peu probable que cette voie métabolique soit impliquée dans l'abaissement du stress protéotoxique chez ces cellules^{72,301,302}. En effet, des souris avec une incapacité à faire de la macroautophagie (souris *Atg5*^{-/-}) ont un développement des thymocytes altéré mais aucun phénotype évident

chez les mTECs³⁰². En outre, la fréquence et le nombre absolu des mTECs est intact chez les thymus de souris *Atg5*^{-/-} et la différenciation des mTECs est également normale³⁰².

Chez les cellules qui synthétisent beaucoup de protéines, l'augmentation de la dégradation protéique représente un mécanisme efficace pour éviter un excès de protéines mal-repliées ou défectueuses²⁴⁵. Nous avons donc étudié l'implication du système ubiquitine-protéasome dans la régulation de la protéostasie chez les mTECs. Chez tous les eucaryotes, ce système est responsable de plus de 70% de la protéolyse intracellulaire et il est impliqué dans la régulation de plusieurs processus cellulaires (cycle cellulaire, division, différenciation, réponse au stress)^{303,304}. Le protéasome est composé d'une particule protéolytique centrale (particule 20S) qui est activée par différentes sous-unités régulatrices afin de dégrader les protéines ubiquitinylées de manière ATP-dépendante³⁰⁵. La particule 20S du protéasome est formée par quatre anneaux heptamériques composés de sous-unités α et β (Figure 4.3)³⁰⁵. En plus du CP, les vertébrés expriment l'IP. Or, les sous-unités qui portent l'activité protéolytique sont différentes pour le CP (PSMB5, PSMB6, PSMB7) et l'IP (PSMB8, PSMB9, PSMB10)^{306,307}.

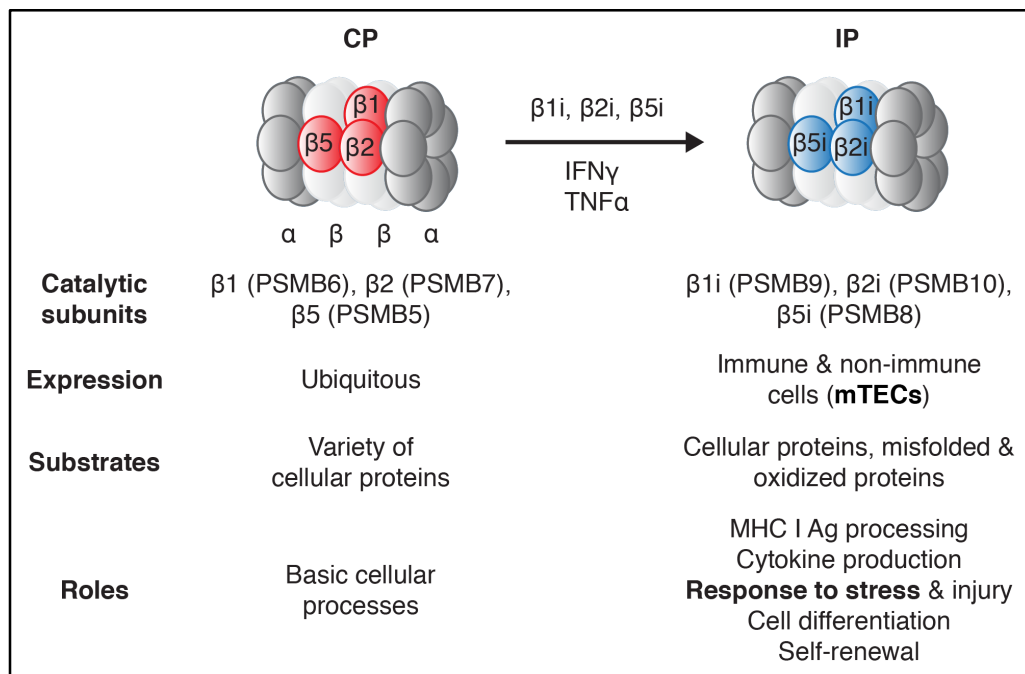


Figure 4.3 Différences majeures entre le CP et l'IP. Adapté et reproduit avec la permission de *Nature Publishing Group* (Groettrup et al⁸³).

Alors que le CP est exprimé de manière constitutive, l'IP est principalement exprimé par des cellules du système immunitaire (lymphocytes, cellules présentatrices d'antigène (macrophages, DCs)). Or, nous avons observé que les mTECs expriment à la fois les sous-unités catalytiques du CP et de l'IP (Figure 3.2A)¹⁹⁰. Selon nos connaissances actuelles des patrons d'expression de l'IP, les mTECs représente le seul exemple de cellules épithéliales qui expriment l'IP en condition non-inflammatoire. Alors que l'IP est principalement reconnu pour sa capacité augmentée à produire des peptides antigéniques liant les molécules du CMH I³⁰⁸⁻³¹¹, l'IP jouent également plusieurs fonctions alternatives y compris la régulation du stress oxydatif et protéotoxique (Figure 4.3)³¹²⁻³¹⁴.

4.3 L'IP est essentiel pour l'homéostasie des mTECs

4.3.1 L'IP contrôle la cellularité des mTECs

Nous avons démontré que les souris dépourvues d'IP ont un phénotype qui touche spécifiquement les mTECs (Figure 3.2). Notamment, les souris dKO postnatales ont trois fois moins de mTECs et les régions médullaires de leur thymus sont beaucoup plus petites. Or, l'absence d'IP n'affecte pas le nombre absolu de cTECs. Cette observation peut être expliquée par le fait que les cTECs expriment majoritairement le thymoprotéasome, qui contient la sous-unité PSMB11 spécialisée dans la production de peptides pour la sélection positive³¹⁵⁻³¹⁸. Puisque l'IP est également exprimé par les thymocytes qui séjournent dans le thymus (Supplemental Figure 3.S3B), nous avons testé si l'hypocellularité en mTECs chez les souris dKO était un phénomène intrinsèque aux mTECs (i. e., cellule-autonome) ou un effet indirect causé par un défaut chez les thymocytes. Cependant, nos données indiquent clairement que ce phénomène est intrinsèque et dépend uniquement de la perte de l'IP chez les mTECs. La perte de mTECs pose plusieurs problèmes. Notamment, les mTECs établissent plusieurs gradients de chimiokines nécessaire à la migration des thymocytes dans le thymus et vers l'extérieur du thymus³¹⁹. De plus, en faisant la sélection négative des thymocytes auto-réactifs, les mTECs sont les juges finals qui décident quels thymocytes vont être exportés vers la périphérie²⁵.

En plus du modèle de souris dKO que nous avons utilisé pour étudier le rôle de l'IP chez les mTECs, un modèle de souris transgénique avec une inactivation de tous les gènes de l'IP (*Psmb8*^{-/-}*Psmb9*^{-/-}*Psmb10*^{-/-}) a également été décrit³¹¹. Conceptuellement, ces souris triple KO représente un modèle particulièrement pertinent, mais en pratique, elles ne présentent pas d'avantages significatifs par rapport au modèle dKO que nous avons utilisé. Entre autre, la conception de la souris triple KO a mené à la délétion de matériel génétique entre les gènes *Psmb8* et *Psmb9* dans le locus des gènes du CMH³¹¹. Notamment, l'expression de TAP1, impliqué dans la présentation antigénique, est diminué de 50% au niveau du transcrit et de la protéine. Une des limitations de ce modèle serait donc que les découvertes potentielles sur la biologie des TECs soient le résultat d'un effet non-spécifique (i. e., expression différentielle de gènes autres que l'IP)³¹¹. L'assemblage de l'IP

opèrent selon des règles de coopérativité, c'est-à-dire que l'incorporation d'une sous-unité favorise l'incorporation subséquente des autres sous-unités³²⁰. Chez les souris dKO, il y a une absence complète de deux sous-unités de l'IP (PSMB8 et PSMB9) et une réduction majeure dans la quantité de la troisième (PSMB9) (Supplemental Figure 3.S3B)³²¹. Malgré le fait que nous avons observé des phénotypes marquants chez les souris dKO, ce modèle sous-estime probablement l'impact de la délétion de l'IP chez les mTECs.

Puisque la sous-unité PSMB8 facilite l'incorporation des sous-unités PSMB9 et PSMB10 dans l'IP, deux hypothèses non-mutuellement exclusives peuvent expliquer l'absence de phénotype chez les mTECs de souris *Psmb8*^{-/-}*Psmb10*^{+/+} (Figure 3.2F). Tout d'abord, même si l'assemblage de protéasomes contenant PSMB9 et PSMB10 est diminué, leur activité catalytique est sans doute suffisante pour modérer le stress protéotoxique. Aussi, l'effet synergique de la délétion de PSMB8 et PSMB10 pourrait dépendre sur des interactions avec des sous-unités régulatrices importantes. En effet, l'incorporation des sous-unités de l'IP induit des effets allostériques qui modifient l'affinité de la particule 20S pour certaines sous-unités régulatrices³²². Il est donc possible que la perte combinée de PSMB8 et de PSMB10 ait des effets synergiques sur la conformation du protéasome, ce qui altère la capacité de la particule 20S à interagir avec des régulateurs tels que les sous-unités PA28αβ, PA200 et PI31³²². Or, ces sous-unités régulatrices ont des effets majeurs sur l'activité de l'IP^{312,323}.

4.3.2 Les souris IP-déficientes développent un syndrome auto-immun

Plusieurs modèles de souris transgéniques avec une réduction sélective de la cellularité des mTECs ont été décrit au fil des années. Pour la plupart, ces souris présentent une inactivation de gènes affectant la prolifération et/ou la différenciation des mTECs. Or, les souris avec un nombre diminué de mTECs ont un phénotype commun : elles développent un syndrome auto-immun caractérisé par des infiltrations de lymphocytes T auto-réactifs dans différents tissus périphériques. Nous avons mis en évidence, qu'en absence d'IP spécifiquement dans les mTECs, les souris dKO développent des manifestations auto-immunes qui apparaissent à partir de 10 semaines d'âge et qui deviennent davantage pénétrantes chez des souris âgées d'un an (Figure 3.3). Ces manifestations auto-immunes prennent la forme de foyers d'infiltration lymphocytaire péri-vasculaires ou interstitiels dans plusieurs tissus. Toutefois, ces manifestations sont moins sévères que celles retrouvés chez des modèles de souris avec une absence complète de mTECs en raison de défauts de différenciation³²⁴. De plus, nous avons observé que les patrons d'auto-immunité sont variables d'une souris à l'autre. Globalement, toutes les souris dKO testés présentaient au moins une manifestation auto-immune, mais montraient des différences interindividuelles importantes en ce qui attrait aux tissus préférentiellement affectés.

Deux facteurs peuvent expliquer la présence d'infiltrats inflammatoires chez les souris dKO. Premièrement, les thymus de souris dKO contiennent un nombre insuffisant de mTECs y compris les mTEC matures principalement responsable de l'établissement de la tolérance au soi. C'est donc dire qu'en entrant dans la médulla thymique, les thymocytes en développement interagissent avec moins de mTECs. Cette pénurie de mTECs permet donc à certains thymocytes auto-réactifs d'outrepasser la sélection négative et de s'échapper vers la périphérie. Deuxièmement, les mTECs résiduelles du thymus de souris dKO n'expriment pas l'IP et ne peuvent donc pas produire le spectre normal de peptides antigéniques qui seront présentés aux thymocytes en tant qu'antigène du soi immunitaire. Or, nous avons mis en évidence que l'absence d'IP diminue d'environ 50% l'expression des molécules du CMH I à la surface des mTECs (résultats non-publiés). L'expression de surface des molécules du CMH I est un indicateur direct de l'approvisionnement global en

peptides antigéniques. En effet, afin d'être acheminé vers la membrane cellulaire, les molécules du CMH I doivent être stabilisées en liant un peptide antigénique³¹¹. Ainsi, chez les souris dKO, certains thymocytes n'apprennent pas à devenir tolérant à ces antigènes du soi dans le thymus et les reconnaissent une fois en périphérie comme un corps étranger.

Chez l'humain, des mutations dans le gène *PSMB8* sont la cause de plusieurs maladies et syndromes auto-immuns caractérisées par des réponses inflammatoires chroniques en absence d'infection^{325,326}. Bien que l'IP joue un rôle important dans la production de nombreuses cytokines lors de réponses inflammatoires dans différentes populations de cellules immunitaires³²⁷⁻³³¹, nos résultats suggèrent que la perte de mTECs dans le thymus pourrait également contribuer à cet état auto-inflammatoire.

4.3.3 L'absence d'IP augmente la susceptibilité des mTECs à l'apoptose

En plus d'être exprimé chez diverse populations de cellules immunitaires, l'IP est également exprimé dans d'autres types cellulaires chez lesquels il joue des fonctions non-immunitaires. Par exemple, l'IP est impliqué dans la différenciation cellulaire des adipocytes et des myoblastes, dans le maintien du potentiel de différenciation des cellules souches embryonnaires ainsi que dans des réponses aux dommages cellulaires dans la rétine et le cerveau^{327,332-334}.

Nous avons donc décidé d'évaluer si l'IP pourrait jouer des fonctions similaires chez les mTECs. Nos résultats ont démontré que les mTEC matures de souris dKO ont une demi-vie beaucoup plus courte que les mTEC matures de souris WT (Figure 3.4A, B). Afin de mieux comprendre ce phénotype, nous avons analysé trois paramètres pouvant contrôler l'homéostasie des mTEC matures : i) la prolifération cellulaire, ii) la différenciation cellulaire et iii) l'apoptose. Au niveau des populations globales de mTECs, la prolifération et la différenciation cellulaire est normale chez les souris dKO. Cependant, nous avons démontré que la demi-vie plus courte des mTEC matures dKO est le résultat d'une apoptose prématurée (Figure 3.4F).

Puisque les mTECs expriment à la fois le CP et l'IP, nous avons étudié si les problèmes homéostatiques chez les mTECs dKO étaient dus à une perte spécifique de l'IP et non à une diminution de l'abondance de protéasomes. Nous avons donc évalué si l'augmentation de la susceptibilité à l'apoptose n'était pas due à une réduction globale de la quantité de protéasome actifs dans les mTEC matures dKO, un artéfact qui causerait un stress protéotoxique²⁷³. En effet, l'inhibition du protéasome standard et même de l'IP mène à un stress protéotoxique important caractérisé par une accumulation de protéines ubiquitinyllées³³⁵. Or, nous avons démontré que les différences dans le maintien homéostatique des mTEC matures dKO étaient dues au type de protéasome exprimé plutôt qu'à des différences quantitatives dans l'abondance de protéasomes. (Figure 3.4G, H).

4.3.4 Les mTECs IP-déficientes montrent un potentiel régénératif diminué suite à un stress thymique aigu

Avant de formellement évaluer comment la perte de l'IP augmente la susceptibilité des mTEC matures à l'apoptose, nous avons évalué si l'IP pouvait contrôler d'autres aspects de la biologie des mTECs *in vivo*. Nous avons notamment évalué le potentiel régénératif des mTECs suite à un stress thymique aigu (Figure 3.5A). Contrairement aux souris exprimant l'IP, les mTEC matures de souris dKO sont incapable d'être régénéré suite à l'ablation cellulaire du compartiment de mTECs. La transplantation de thymus sous la capsule rénale représente un stress aigu important, car une fois transplanté, les cellules du greffon traversent une période d'apoptose avant d'être régénéré³³⁶⁻³³⁸. Or, les mTECs de thymus dKO ont un potentiel diminué à greffer lorsque transplanté chez des souris receveuses (Figure 3.3E, F). La transplantation de thymus représente une application pédiatrique chez les patients athymique souffrant du syndrome DiGeorge³³⁹⁻³⁴¹. Afin de reconstituer des lymphocytes T matures chez ces individus, des fragments de thymus provenant d'un donneur allogénique sont mis en culture avant d'être transplanté dans les muscles du quadriceps du receveur athymique³³⁹⁻³⁴¹. Toutefois, la détection d'une activité thymopoïétique dans les biopsies de thymus et la production de lymphocytes T naïfs périphériques peut prendre plusieurs mois³⁴². Or, nos découvertes pourraient avoir des implications cliniques importantes pour la transplantation de thymus. En effet, nos résultats montrent que la capacité des mTECs à greffer est diminué en absence d'IP et en présence de stress protéotoxique. Afin d'optimiser la greffe de thymus chez l'humain, les thymus de donneurs allogéniques pourraient être conditionnés à un traitement permettant de diminuer le stress protéotoxique. Par exemple, des chaperones chimiques réduisant le stress protéotoxique (TUDCA, 4-PBA) ont déjà été approuvé par l'agence réglementaire américaine d'approbation des médicaments (FDA). Notamment, ces petites molécules favorisent la survie cellulaire en diminuant l'accumulation d'agrégats de protéines toxiques dans plusieurs modèles expérimentaux de maladies neurodégénératives³⁴³⁻³⁴⁵. Aussi, l'utilisation de petites molécules augmentant l'activité globale du protéasome pourrait également être envisagé pour augmenter l'efficacité de la greffe de thymus³⁴⁶.

4.3.5 L'IP détermine le potentiel de différenciation des progéniteurs de mTECs

Chez les souris postnatales, la régénération des TECs repose sur différentes populations de cellules progénitrices³⁸. Nous avons donc émis l'hypothèse que la diminution du potentiel régénératif des mTEC matures dKO (Figure 3.5A) était causée par une perte d'activité des progéniteurs de TECs, qui s'épuise rapidement en raison d'un renouvellement constant des mTEC matures. Une des approches expérimentales typiques pour étudier des populations de cellules souches épithéliales *ex vivo* consiste à exploiter leur habileté à former des colonies sphéroïdes dans des conditions de culture clonogénique qui supportent la survie et la croissance des cellules souches épithéliales (Figure 3.5B, C)^{347,348}. Grâce à cette approche, nous avons mis en évidence que les progéniteurs bipotents de TECs dKO ont une capacité diminuée à générer des mTECs (Figure 3.5E, F). Bien que nos conditions de culture clonogénique ont permis de détecter des colonies formées par des progéniteurs bipotents de TECs et des progéniteurs unipotents de cTECs, nous n'avons pas observé de colonies issues de progéniteurs unipotents de mTECs^{193,349}. Or, nous croyons qu'en complétant nos analyses avec d'autres types d'essai de clonogénicité (transplantation de TECs, co-culture avec fibroblastes embryonnaires murin), nous pourrions révéler des différences majeures dans la biologie des progéniteurs unipotents de mTECs provenant de souris dKO (i. e., nombre absolu et activité clonogénique).

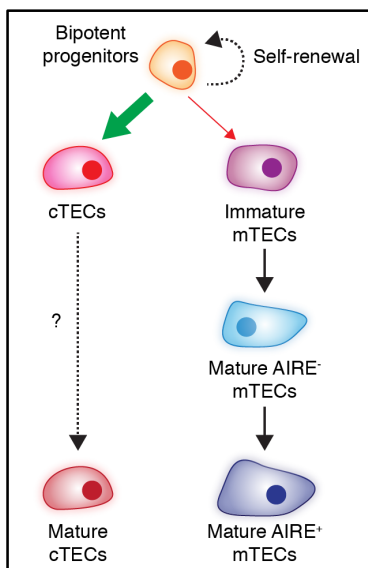


Figure 4.4 Potentiel de différenciation des progéniteurs bipotents de TECs chez les souris dKO. Chez l'adulte, les TECs sont maintenus par des populations de progéniteurs bipotents qui s'auto-renouvellent. Des populations de progéniteurs unipotents contrôlent également le maintien homéostatique des cTECs (gauche) et des mTECs (droite). Les mTECs contiennent deux sous-populations : une population de mTEC immatures qui sont les précurseurs des mTEC matures. Chez les souris dKO, les progéniteurs bipotents de TECs ont une capacité diminuée à générer des mTECs.

Nos données montrent que les progéniteurs de TECs bipotents de souris dKO ont perdu une caractéristique typique des cellules souches adultes, soit leur capacité à se différencier en différents types cellulaires (Figure 4.4). De plus, il est formellement possible qu'après plusieurs passages successifs in vitro, les progéniteurs de TECs de souris dKO perdent plus rapidement leur potentiel d'auto-renouvellement et reforment ainsi moins de colonies de cellules filles que les progéniteurs de souris WT. Nos données supportent la notion que chez les souris dKO, une pression considérable est imposée aux progéniteurs de TECs, qui sont constamment sollicités pour produire des mTEC matures avec une demi-vie très courte. Or, nous croyons que ces progéniteurs n'arrivent pas à maintenir un faible taux de division cellulaire, une caractéristique également associée aux cellules souches adultes³⁵⁰⁻³⁵². Des analyses supplémentaires sont donc requises afin de déterminer si les progéniteurs de TECs dKO acquièrent un phénotype associé aux cellules post-mitotiques en sénescence répllicative (i. e., surexpression de TP53, p21WAF1, p16INK4a et p19ARF)³⁵³.

4.3.6 Les mTECs dépourvues d'IP activent un mécanisme adaptatif contre le stress protéotoxique

Chez les souris dKO, le phénotype des mTECs est similaire à celui de cellules qui s'ont exposé à un stress protéotoxique chronique. Notamment, le stress protéotoxique chronique mène inévitablement à une perte d'intégrité fonctionnelle au niveau cellulaire en plus de diminuer le potentiel régénératif²⁴⁶. De plus, comme les mTEC matures de souris dKO, les cellules qui endurent un stress protéotoxique chronique activent des réponses biochimiques qui augmentent la susceptibilité à l'apoptose²⁴⁹. Nous avons donc émis l'hypothèse que le stress protéotoxique pourrait être la cause primaire menant à une réduction de la taille du compartiment de mTECs chez les souris dKO.

Afin d'évaluer si les mTECs de souris dKO étaient plus susceptibles au stress protéotoxique, nous avons analysé l'état d'activation de la réponse UPR, un mécanisme adaptatif permettant de rétablir la protéostasie²⁴⁷. Premièrement, nos données ont montré qu'en conditions physiologiques, les mTEC matures dKO montrent un niveau d'activation augmenté de la branche PERK de la réponse UPR, caractérisé par une augmentation de eIF2 α phosphorylé et une diminution des taux de synthèse protéique (Figure 3.6A, B). En abaissant leur taux de synthèse protéique, les mTEC matures traduisent probablement moins de gènes promiscuitaires en protéines, ce qui perpétue davantage les défauts dans la tolérance au soi chez les souris dKO. Pour trouver d'autres évidences de stress protéotoxique chez les mTECs de souris dKO, nous avons développé un essai *in vitro* d'induction pharmacologique de stress protéotoxique en utilisant des cultures de thymus fœtal (FTOCs). Cette approche représente une méthode de choix pour tester l'effet de petites molécules directement sur les TECs, car les FTOCs peuvent être débarrassés des cellules lymphoïdes, qui représentent plus de 95% de la cellularité totale du thymus. Nous avons donc traité les FTOCs provenant de souris WT et dKO à la tunicamycine, une petite molécule utilisée pour analyser la susceptibilité au stress protéotoxique et qui perturbe le repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique (Figure 3.6D, E)³⁵⁴. Nous avons utilisé cet inducteur puissant de stress protéotoxique afin de mettre en évidence des différences marquantes dans la gestion du stress entre les mTECs WT et dKO. Ces analyses pharmacologiques *in vitro* représentaient donc un complément à nos études *in vivo*, qui

suggéraient fortement que les mTEC matures dKO étaient excessivement susceptibles au stress protéotoxique. Or, notre système de culture de thymus pourrait également être utilisé afin d'induire un stress protéotoxique modéré (i. e., par déprivation de glucose, traitement au palmitate) dont l'intensité se rapprocherait davantage du degré de stress auquel sont exposées les mTECs en conditions physiologique³⁵⁴. Néanmoins, en comparant les cTECs et les mTECs des organes WT et dKO traités ou non à la tunicamycine, nous avons démontré que l'IP préserve la viabilité cellulaire, mais seulement dans les mTECs qui étaient exposé au stress protéotoxique (Figure 3.6F). Or, chez des lignées cellulaires de leucémies myéloïdes aiguës, l'IP est également reconnu comme un régulateur majeur de la survie cellulaire en atténuant le stress protéotoxique³³⁵. En parallèle, nous avons analysé l'expression chez les mTECs, de gènes classiques induit par le stress protéotoxique. Alors que les mTECs exprimant l'IP peuvent gérer relativement efficacement le stress protéotoxique, nos données ont montré que le traitement à la tunicamycine chez les mTECs dépourvues d'IP induit une surexpression drastique de gènes associés au stress protéotoxique (Figure 3.6G). Bien que nos analyses étaient restreintes à l'état d'activation de la réponse UPR, d'autres marqueurs de stress protéotoxique auraient pu être étudié dans notre modèle. Notamment, l'accumulation d'agrégats de protéine mal-repliées, la surabondance de protéines poly-ubiquitinylées et la dilatation du réticulum endoplasmique sont tous des paramètres qui auraient pu être étudiés chez les thymus cultivés en présence d'inducteurs de stress protéotoxique³⁵⁴. Dans leur ensemble, nos travaux de recherche supportent un modèle selon lequel l'augmentation du stress protéotoxique chez les mTECs dépourvues d'IP enclenche une cascade d'événements ayant des effets importants sur la biologie des mTECs et la fonction du thymus (Figure 4.5). Notamment, les mTEC matures de souris dKO montrent une sur-activation de voies de la réponse UPR et ont donc une susceptibilité accrue à l'apoptose. En revanche, les progéniteurs de mTECs s'épuisent rapidement, car ils doivent constamment renouveler le compartiment de mTEC matures qui ont une courte demi-vie. Finalement, l'absence d'IP mène à une involution thymique prématurée caractérisée par une perte sélective des mTECs et un syndrome auto-immun affectant plusieurs organes.

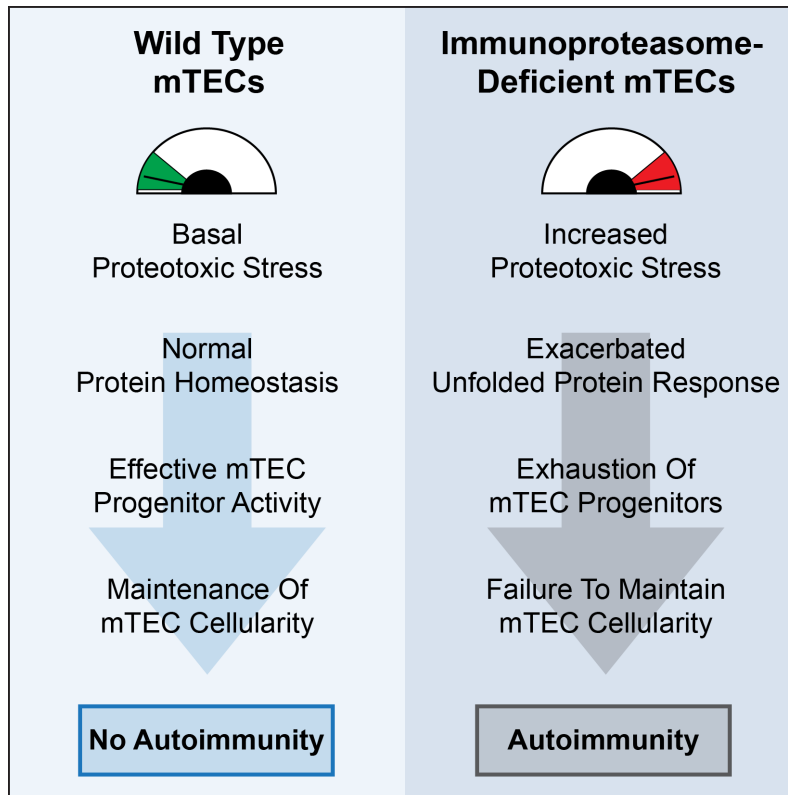


Figure 4.5 Impact de l'IP sur la biologie des mTECs. Chez les mTECs de souris sauvages (WT), l'IP atténue le stress protéotoxique imposé par l'EGP et la cellularité du compartiment de mTECs est maintenue. Chez les mTECs dépourvues d'IP, l'augmentation du stress protéotoxique enclenche une série d'événements biochimiques et cellulaires menant à une déplétion sévère du compartiment de mTECs et à des manifestations auto-immunes affectant plusieurs organes.

4.3.7 Le rôle de l'IP ne se limite pas à la production d'antigènes

Nos résultats montrent que l'IP joue un rôle non-redondant dans les mTECs en atténuant le stress protéotoxique. Or, la régulation du stress oxydatif et protéotoxique est sans doute le rôle le plus conservé de l'IP, car des orthologues aux sous-unités PSMB8 et PSMB9 ont été retrouvés chez plusieurs espèces d'invertébrés dépourvues de système immunitaire adaptatif³⁵⁵. De plus, plusieurs évidences suggèrent que la surexpression de l'IP dans plusieurs cellules non-immunitaires en conditions pathologiques représente un mécanisme compensatoire pour augmenter la capacité de clairance des protéines^{300,356}. Par exemple, une induction de l'IP est observée dans plusieurs maladies neurodégénératives chez des cellules neuronales exposées à des agrégats toxiques de protéines^{334,357-359}. Or, en diminuant l'activité d'un régulateur négatif de l'activité protéasomale (USP14), une clairance augmentée des protéines susceptibles à l'agrégation (α -synucléine, tau) est observée^{244,245,360,361}. Toutefois, il reste à déterminer si ces agrégats liés à la neurodégénération représentent des substrats préférentiels de l'IP par rapport au CP³⁶². Puisque l'activité protéasomale globale tend à diminuer avec l'âge chez les cellules d'eukaryotes³⁶³, il sera capital d'évaluer l'expression, l'activité et la nature des protéasomes assemblés chez les mTECs avec l'âge chez la souris. De plus, des modèles précliniques devront être utilisés afin d'établir la preuve de concept que l'augmentation de l'activité protéasomale et/ou la diminution du stress protéotoxique dans les mTECs est suffisant pour prévenir l'involution thymique^{323,360,361,364}. Deux autres modèles animaux pourraient être utilisés afin d'appuyer nos découvertes sur le vieillissement du thymus. Le thymus du rat-taupe nu est un sujet d'étude pertinent, car ces animaux ont des niveaux élevés d'IP et une activité protéasomale supérieure qui leur permet de rester en vie beaucoup plus longtemps. Or, il demeure inconnu si le rat-taupe nu maintient une fonction thymique élevée avec l'âge. Le rat LOU a également une espérance de vie augmentée caractérisée par le maintien d'une faible masse adipeuse et d'une faible incidence de maladies liées à l'âge³⁶⁵. De plus, les rats LOU sont plus résistants aux dommages oxydatifs dans différentes régions du cerveau associées à des maladies neurodégénératives³⁶⁶. Il serait donc intéressant de déterminer si ces rats peuvent tolérer davantage le stress protéotoxique imposé aux mTECs et d'évaluer si leur thymus reste jeune plus longtemps.

4.3.8 Pertinences cliniques des découvertes

À l'instar des inhibiteurs du protéasome (ex. bortezomib, carfilzomib, marizomib) utilisés pour le traitement du myélome multiple, les molécules qui augmentent l'activité protéasomale pourraient avoir une valeur thérapeutique chez les patients non-cancéreux^{346,367}. Notamment, ces petites molécules pourraient représenter une intervention thérapeutique pertinente pour le traitement de certaines maladies neurodégénératives en augmentant la clairance de protéines toxiques²⁴⁵. Toutefois, peu de molécules sont reconnues pour augmenter l'activité protéasomale *in vivo* (sulforaphane, rolipram, forskolin, IU1)^{346,360,368–370}. Puisque le thymus développe une susceptibilité au stress protéotoxique qui est analogue aux protéinopathies du système nerveux central, l'utilisation de ces molécules pourrait être étendue à d'autres types d'indications tel que le rajeunissement du thymus. Cependant, les facteurs permettant de sélectionner les patients les plus susceptibles de bénéficier du rajeunissement du thymus à long terme demeurent incertains. Or, nos découvertes ont des implications cliniques pour les jeunes patients avec une absence congénitale de thymus et les enfants en bas âge qui subissent une thymectomie lors de chirurgies cardio-thoraciques. En effet, nos découvertes pourraient permettre la conception de formules de conditionnement pour augmenter l'activité protéasomale des cellules de greffons allogéniques de thymus. Cela permettrait de réduire le stress protéotoxique et ainsi d'augmenter le potentiel régénératif essentiel au succès de la greffe. En plus de la greffe de thymus, nos découvertes pourraient également bénéficier aux patients recevant des traitements de chimiothérapie et/ou de radiothérapie, qui représentent les premières lignes de traitements pour de nombreux cancers. Après les cycles de thérapies cytoablatives, ces patients pourraient recevoir des traitements visant à régénérer leur thymus afin de reconstituer leurs défenses immunitaires adaptatives plus rapidement. Finalement, nos données suggèrent que le rajeunissement du thymus représente davantage une intervention thérapeutique prophylactique, car le potentiel régénératif du thymus est significativement diminué lorsqu'il est déjà atrophié. Ainsi, les interventions thérapeutiques visant à rajeunir le thymus devraient être pratiquées en bas âge afin de prévenir l'involution thymique et de maintenir la fonction optimale du thymus à plus long terme.

Conclusion

Bien que l'involution thymique représente sans doute un processus multifactoriel, nos travaux supportent un nouveau paradigme permettant d'expliquer la susceptibilité élevée du thymus à s'atrophier.

Premièrement, nous avons découvert que l'EGP avait un effet beaucoup plus vaste que précédemment anticipé sur le programme transcriptionnel des mTEC matures. De plus, nos travaux sont les premiers à démontrer que l'EGP a un impact majeur sur l'activité traductionnelle des mTEC matures ainsi que sur les mécanismes qu'utilisent ces cellules pour maintenir l'homéostasie des protéines. En effet, bien que l'EGP permette aux mTECs d'établir la tolérance au soi, le prix à payer pour l'EGP est une augmentation des taux de synthèse protéique et de la susceptibilité au stress protéotoxique dans les mTECs, qui ont besoin de l'IP pour atténuer ce stress. Or, l'accumulation de stress protéotoxique dans les mTECs induit plusieurs caractéristiques propres au vieillissement cellulaire et représente donc un facteur intrinsèque au thymus expliquant son involution prématurée.

Le dogme actuel maintient que le rôle prédominant de l'IP dans les mTECs est de générer des peptides pour la tolérance au soi immunitaire. Cependant, nos travaux identifient l'IP comme un régulateur majeur de l'homéostasie des mTECs et fournissent une explication pour l'expression constitutive de l'IP dans ces cellules. Notamment, nous avons montré que la perte de l'IP cause un épuisement rapide des cellules souches de mTECs et que les souris dépourvues d'IP présentent une involution thymique accélérée et un syndrome auto-immun affectant plusieurs organes.

Ainsi, nos découvertes supportent un modèle selon lequel le mécanisme utilisé pour armer notre système immunitaire contre les assaillants pathologiques condamne le thymus à subir un vieillissement accéléré. En effet, si les mTECs n'avaient pas à travailler aussi fort pour se débarrasser d'une quantité importante de protéines, cela préviendrait leur vieillissement cellulaire prématuré et permettrait au thymus de rester plus jeune plus longtemps.

Bibliographie

1. Mannie, M. D. Immunological self/nonself discrimination: integration of self vs nonself during cognate T cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunol. Res.* **19**, 65–87 (1999).
2. Sprent, J. & Cho, J.-H. Self/non-self discrimination and the problem of keeping T cells alive. *Immunol. Cell Biol.* **86**, 54–56 (2008).
3. Hoebe, K., Janssen, E. & Beutler, B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* **5**, 971–974 (2004).
4. Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S. & Simon, H. U. Living and dying for inflammation: Neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends in Immunology* **34**, 398–409 (2013).
5. Lai, A. Y. & Kondo, M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Seminars in Immunology* **20**, 207–212 (2008).
6. Rieger, M. A. & Schroeder, T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a008250 (2012).
7. Newton, K. & Dixit, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a006049 (2012).
8. Eisen, H. N. Specificity and degeneracy in antigen recognition: yin and yang in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 1–21 (2001).
9. Nikolich-Zugich, J., Slifka, M. K. & Messaoudi, I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 123–132 (2004).
10. Ahmed, R. & Gray, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**, 54–60 (1996).
11. Boehm, T. Design principles of adaptive immune systems. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 307–317 (2011).
12. Nemazee, D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 19–51 (2000).
13. Davis, S. J. *et al.* The nature of molecular recognition by T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 217–224 (2003).
14. Krangel, M. S. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Current Opinion*

- in Immunology* **21**, 133–139 (2009).
15. Oettinger, M. A. Activation of V(D)J recombination by RAG1 and RAG2. *Trends in Genetics* **8**, 413–416 (1992).
 16. Richards, D. M., Kyewski, B. & Feuerer, M. Re-examining the nature and function of self-reactive T cells. *Trends Immunol.* **37**, 114–125 (2016).
 17. Granados, D. P., Laumont, C. M., Thibault, P. & Perreault, C. The nature of self for T cells-a systems-level perspective. *Current Opinion in Immunology* **34**, 1–8 (2015).
 18. Rossjohn, J. *et al.* T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 169–200 (2015).
 19. Caron, E. *et al.* The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 533 (2014).
 20. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 388–400 (2015).
 21. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
 22. Roche, P. A. & Furuta, K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 203–216 (2015).
 23. Gascoigne, N. R. J. Do T cells need endogenous peptides for activation? *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 895–900 (2008).
 24. Hogquist, K. A. & Jameson, S. C. The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate ‘decisions’ and effector function. *Nat. Immunol.* **15**, 815–823 (2014).
 25. Hogquist, K. a, Baldwin, T. a & Jameson, S. C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 772–782 (2005).
 26. Chakraborty, A. K. & Weiss, A. Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat. Immunol.* **15**, 798–807 (2014).
 27. Sprent, J. & Surh, C. D. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat. Immunol.* **131**, 478–484 (2011).
 28. Jameson, S. C. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 547–556 (2002).
 29. Milner, J. D. & Holland, S. M. The cup runneth over: lessons from the ever-

- expanding pool of primary immunodeficiency diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 635–648 (2013).
30. Boehm, T., Hess, I. & Swann, J. B. Evolution of lymphoid tissues. *Trends in Immunology* **33**, 315–321 (2012).
 31. Bajoghli, B. *et al.* A thymus candidate in lampreys. *Nature* **470**, 90–94 (2011).
 32. Corbeaux, T. *et al.* Thymopoiesis in mice depends on a Foxn1-positive thymic epithelial cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16613–16618 (2010).
 33. Swann, J. B. *et al.* Conversion of the thymus into a bipotent lymphoid organ by replacement of Foxn1 with its paralog, Foxn4. *Cell Rep.* **8**, 1184–1197 (2014).
 34. Gordon, J. & Manley, N. R. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development* **138**, 3865–3878 (2011).
 35. Blackburn, C. C. & Manley, N. R. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 278–289 (2004).
 36. Rodewald, H.-R. Thymus organogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 355–388 (2008).
 37. Takahama, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 127–135 (2006).
 38. Abramson, J. & Anderson, G. Thymic epithelial cells. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 85–118 (2017).
 39. Pignata, C. *et al.* Congenital alopecia and nail dystrophy associated with severe functional T-cell immunodeficiency in two sibs. *Am. J. Med. Genet.* **65**, 167–170 (1996).
 40. Nowell, C. S., Farley, A. M. & Blackburn, C. C. Thymus organogenesis and development of the thymic stroma. *Methods Mol. Biol.* **380**, 125–162 (2007).
 41. Anderson, G. & Takahama, Y. Thymic epithelial cells: Working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol.* **33**, 256–263 (2012).
 42. Boehm, T. & Swann, J. B. Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin? *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 831–838 (2013).
 43. Ciofani, M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 463–493 (2007).
 44. Rossi, S. W., Jenkinson, W. E., Anderson, G. & Jenkinson, E. J. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature*

- 441**, 988–991 (2006).
45. Bleul, C. C. *et al.* Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* **441**, 992–996 (2006).
 46. Takahama, Y., Ohigashi, I., Baik, S. & Anderson, G. Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 295–305 (2017).
 47. Su, D., Navarre, S., Oh, W., Condie, B. G. & Manley, N. R. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat. Immunol.* **4**, 1128–1135 (2003).
 48. Žuklys, S. *et al.* Foxn1 regulates key target genes essential for T cell development in postnatal thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* **17**, 1206–1215 (2016).
 49. Bleul, C. C. & Boehm, T. BMP signaling is required for normal thymus development. *J. Immunol.* **175**, 5213–5221 (2005).
 50. Gordon, J., Patel, S. R., Mishina, Y. & Manley, N. R. Evidence for an early role for BMP4 signaling in thymus and parathyroid morphogenesis. *Dev. Biol.* **339**, 141–154 (2010).
 51. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat. Immunol.* **3**, 1102–1108 (2002).
 52. Heinonen, K. M. *et al.* Wnt4 regulates thymic cellularity through the expansion of thymic epithelial cells and early thymic progenitors. *Blood* **118**, 5163–5173 (2011).
 53. Zuklys, S. *et al.* Stabilized beta-catenin in thymic epithelial cells blocks thymus development and function. *J. Immunol.* **182**, 2997–3007 (2009).
 54. Liu, B. *et al.* Cbx4 regulates the proliferation of thymic epithelial cells and thymus function. *Development* **140**, 780–788 (2013).
 55. Candi, E. *et al.* DeltaNp63 regulates thymic development through enhanced expression of FgfR2 and Jag2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11999–12004 (2007).
 56. Senoo, M., Pinto, F., Crum, C. P. & McKeon, F. p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* **129**, 523–536 (2007).
 57. Khan, I. S., Taniguchi, R. T., Fasano, K. J., Anderson, M. S. & Jeker, L. T. Canonical microRNAs in thymic epithelial cells promote central tolerance. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1313–1319 (2014).

58. Zuklys, S. *et al.* MicroRNAs control the maintenance of thymic epithelia and their competence for T lineage commitment and thymocyte selection. *J. Immunol.* **189**, 3894–3904 (2012).
59. Rossi, S. W. *et al.* Keratinocyte growth factor (KGF) enhances postnatal T-cell development via enhancements in proliferation and function of thymic epithelial cells. *Blood* **109**, 3803–3811 (2007).
60. Sitnik, K. M. *et al.* Mesenchymal cells regulate retinoic acid receptor-dependent cortical thymic epithelial cell homeostasis. *J. Immunol.* **188**, 4801–4809 (2012).
61. Hikosaka, Y. *et al.* The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. *Immunity* **29**, 438–450 (2008).
62. Akiyama, T. *et al.* The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* **29**, 423–437 (2008).
63. Mouri, Y. *et al.* Lymphotoxin signal promotes thymic organogenesis by eliciting RANK expression in the embryonic thymic stroma. *J. Immunol.* **186**, 5047–5057 (2011).
64. Baik, S., Sekai, M., Hamazaki, Y., Jenkinson, W. E. & Anderson, G. Relb acts downstream of medullary thymic epithelial stem cells and is essential for the emergence of RANK⁺ medullary epithelial progenitors. *Eur. J. Immunol.* **46**, 857–862 (2016).
65. Lkhagvasuren, E., Sakata, M., Ohigashi, I. & Takahama, Y. Lymphotoxin receptor regulates the development of CCL21-expressing subset of postnatal medullary thymic epithelial cells. *J. Immunol.* **190**, 5110–5117 (2013).
66. Rossi, S. W. *et al.* RANK signals from CD4⁺3[−] inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J. Exp. Med.* **204**, 1267–1272 (2007).
67. Goldfarb, Y. *et al.* HDAC3 is a master regulator of mTEC development. *Cell Rep.* **15**, 651–665 (2016).
68. Hauri-Hohl, M., Zuklys, S., Holländer, G. a & Ziegler, S. F. A regulatory role for TGF- β signaling in the establishment and function of the thymic medulla. *Nat.*

- Immunol.* **15**, 554–561 (2014).
69. Miller, J. F. A. P. The golden anniversary of the thymus. *Nature Reviews Immunology* **11**, 489–495 (2011).
 70. Carpenter, A. C. & Bosselut, R. Decision checkpoints in the thymus. *Nature Immunology* **11**, 666–673 (2010).
 71. Petrie, H. T. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 649–679 (2007).
 72. Klein, L., Hinterberger, M., Wünsch, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 833–844 (2009).
 73. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377–391 (2014).
 74. Robey, E. A. T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol. Rev.* **271**, 114–126 (2016).
 75. Zhang, S. L. & Bhandoola, A. Trafficking to the thymus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **373**, 87–111 (2013).
 76. Cowan, J. E., Jenkinson, W. E. & Anderson, G. Thymus medulla fosters generation of natural Treg cells, invariant $\gamma\delta$ T cells, and invariant NKT cells: What we learn from intrathymic migration. *Eur. J. Immunol.* **45**, 652–660 (2015).
 77. Palmer, E. & Naehre, D. Affinity threshold for thymic selection through a T-cell receptor-co-receptor zipper. *Nature Reviews Immunology* **9**, 207–213 (2009).
 78. Legoux, F. P. *et al.* CD4 + T cell tolerance to tissue-restricted self antigens is mediated by antigen-specific regulatory T cells rather than deletion. *Immunity* **43**, 896–908 (2015).
 79. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 523–532 (2008).
 80. Aschenbrenner, K. *et al.* Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* **8**, 351–358 (2007).

81. Wirnsberger, G., Hinterberger, M. & Klein, L. Regulatory T-cell differentiation versus clonal deletion of autoreactive thymocytes. *Immunology and Cell Biology* **89**, 45–53 (2011).
82. Derbinski, J. & Kyewski, B. How thymic antigen presenting cells sample the body's self-antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 592–600 (2010).
83. Groettrup, M., Kirk, C. J. & Basler, M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 73–78 (2010).
84. Kniepert, A. & Groettrup, M. The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 17–24 (2014).
85. Nil, A., Firat, E., Sobek, V., Eichmann, K. & Niedermann, G. Expression of housekeeping and immunoproteasome subunit genes is differentially regulated in positively and negatively selecting thymic stroma subsets. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2681–2689 (2004).
86. Oh, K. I. & Seo, J. N. Expression pattern of immunoproteasome subunits in human thymus. *Immune Netw.* **9**, 285–288 (2009).
87. Magalhães, D. a R. *et al.* Promiscuous gene expression in the thymus: the root of central tolerance. *Clin. Dev. Immunol.* **13**, 81–99 (2006).
88. Derbinski, J. *et al.* Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* **202**, 33–45 (2005).
89. Sansom, S. N. *et al.* Population and single cell genomics reveal the Aire-dependency, relief from polycomb silencing and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Res.* **24**, 1918–1931 (2014).
90. St-Pierre, C., Trofimov, A., Brochu, S., Lemieux, S. & Perreault, C. Differential features of AIRE-induced and AIRE-independent promiscuous gene expression in thymic epithelial cells. *J. Immunol.* **195**, 498–506 (2015).
91. Kyewski, B. & Derbinski, J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 688–698 (2004).
92. Guerder, S., Viret, C., Luche, H., Ardouin, L. & Malissen, B. Differential processing of self-antigens by subsets of thymic stromal cells. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 99–104 (2012).
93. Gallegos, A. M. & Bevan, M. J. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol.*

Rev. **209**, 290–296 (2006).

94. Danso-Abeam, D. *et al.* Aire mediates thymic expression and tolerance of pancreatic antigens via an unconventional transcriptional mechanism. *Eur. J. Immunol.* **43**, 75–84 (2013).
95. Villaseñor, J., Besse, W., Benoist, C. & Mathis, D. Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15854–15859 (2008).
96. Brennecke, P. *et al.* Single-cell transcriptome analysis reveals coordinated ectopic gene-expression patterns in medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* **16**, 933–941 (2015).
97. Meredith, M., Zemmour, D., Mathis, D. & Benoist, C. Aire controls gene expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity. *Nat. Immunol.* **16**, 942–949 (2015).
98. Rattay, K., Meyer, H. V., Herrmann, C., Brors, B. & Kyewski, B. Evolutionary conserved gene co-expression drives generation of self-antigen diversity in medullary thymic epithelial cells. *J. Autoimmun.* **67**, 65–75 (2015).
99. Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395–1401 (2002).
100. Hubert, F.-X. *et al.* A specific anti-Aire antibody reveals aire expression is restricted to medullary thymic epithelial cells and not expressed in periphery. *J. Immunol.* **180**, 3824–3832 (2008).
101. Arstila, T. P. & Jarva, H. Human APECED; a sick thymus syndrome? *Front. Immunol.* **4**, 313 (2013).
102. De Martino, L. *et al.* APECED: a paradigm of complex interactions between genetic background and susceptibility factors. *Front. Immunol.* **4**, 331 (2013).
103. Mathis, D. & Benoist, C. Aire. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 287–312 (2009).
104. Villaseñor, J., Benoist, C. & Mathis, D. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunol. Rev.* **204**, 156–164 (2005).
105. Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L. & Goodnow, C. C. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 350–354 (2003).
106. Org, T. *et al.* The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone

- H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep.* **9**, 370–376 (2008).
107. Žumer, K., Low, A. K., Jiang, H., Saksela, K. & Peterlin, B. M. Unmodified histone H3K4 and DNA-dependent protein kinase recruit autoimmune regulator to target genes. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1354–1362 (2012).
 108. Koh, A. S. *et al.* Aire employs a histone-binding module to mediate immunological tolerance, linking chromatin regulation with organ-specific autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15878–15883 (2008).
 109. Koh, A. S., Kingston, R. E., Benoist, C. & Mathis, D. Global relevance of Aire binding to hypomethylated lysine-4 of histone-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13016–13021 (2010).
 110. Waterfield, M. *et al.* The transcriptional regulator Aire coopts the repressive ATF7ip-MBD1 complex for the induction of immunotolerance. *Nat. Immunol.* **15**, 258–265 (2014).
 111. Yang, S., Bansal, K., Lopes, J., Benoist, C. & Mathis, D. Aire's plant homeodomain(PHD)-2 is critical for induction of immunological tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1833–1838 (2013).
 112. Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C. & Mathis, D. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* **140**, 123–135 (2010).
 113. Tao, Y. *et al.* AIRE recruits multiple transcriptional components to specific genomic regions through tethering to nuclear matrix. *Mol. Immunol.* **43**, 335–345 (2006).
 114. Giraud, M. *et al.* An RNAi screen for Aire cofactors reveals a role for Hnrnp1 in polymerase release and Aire-activated ectopic transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1491–1496 (2014).
 115. Anderson, M. S. *et al.* The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* **23**, 227–239 (2005).
 116. Abramson, J. & Goldfarb, Y. AIRE : From promiscuous molecular partnerships to promiscuous gene expression. *Eur. J. Immunol.* **46**, 22–33 (2015).
 117. Giraud, M. *et al.* Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 535–540 (2012).
 118. Oven, I. *et al.* AIRE recruits P-TEFb for transcriptional elongation of target genes

- in medullary thymic epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8815–8823 (2007).
119. Liiv, I. *et al.* DNA-PK contributes to the phosphorylation of AIRE: Importance in transcriptional activity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1783**, 74–83 (2008).
 120. Takaba, H. *et al.* Fezf2 orchestrates a thymic program of self-antigen expression for immune tolerance. *Cell* **163**, 975–987 (2015).
 121. Anderson, M. S. & Su, M. A. AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 247–258 (2016).
 122. Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J. & van Deursen, J. M. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Med.* **21**, 1424–1435 (2015).
 123. Rezzani, R., Nardo, L., Favero, G., Peroni, M. & Rodella, L. F. Thymus and aging: Morphological, radiological, and functional overview. *Age* **36**, 313–351 (2014).
 124. Lynch, H. E. *et al.* Thymic involution and immune reconstitution. *Trends in Immunology* **30**, 366–373 (2009).
 125. Aw, D., Silva, A. B., Maddick, M., von Zglinicki, T. & Palmer, D. B. Architectural changes in the thymus of aging mice. *Aging Cell* **7**, 158–167 (2008).
 126. Mori, K., Itoi, M., Tsukamoto, N., Kubo, H. & Amagai, T. The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma. *Int. Immunol.* **19**, 745–753 (2007).
 127. Gray, D. H. *et al.* Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* **108**, 3777–3785 (2006).
 128. Torroba, M. & Zapata, A. G. Aging of the Vertebrate Immune System. *Microsc. Res. Tech.* **62**, 477–481 (2003).
 129. Dixit, V. D. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. *Current Opinion in Immunology* **22**, 521–528 (2010).
 130. Sempowski, G. D. *et al.* Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J. Immunol.* **164**, 2180–2187 (2000).
 131. Dixit, V. D. Impact of immune-metabolic interactions on age-related thymic demise and T cell senescence. *Seminars in Immunology* **24**, 321–330 (2012).
 132. Ventevogel, M. S. & Sempowski, G. D. Thymic rejuvenation and aging. *Current*

- Opinion in Immunology* **25**, 516–522 (2013).
133. Goronzy, J. J., Lee, W. W. & Weyand, C. M. Aging and T-cell diversity. *Experimental Gerontology* **42**, 400–406 (2007).
 134. Qi, Q., Zhang, D. W., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. Mechanisms shaping the naïve T cell repertoire in the elderly - Thymic involution or peripheral homeostatic proliferation? *Exp. Gerontol.* **54**, 71–74 (2014).
 135. Nikolich-Zugich, J. Aging of the T cell compartment in mice and humans: From naïve expectations to foggy memories. *J. Immunol.* **193**, 2622–2629 (2014).
 136. Aspinall, R. & Andrew, D. Thymic involution in aging. *Journal of Clinical Immunology* **20**, 250–256 (2000).
 137. Aw, D. & Palmer, D. B. The origin and implication of thymic involution. *Aging Dis.* **2**, 437–443 (2011).
 138. Gui, J., Mustachio, L. M., Su, D.-M. & Craig, R. W. Thymus size and age-related thymic involution: early programming, sexual dimorphism, progenitors and stroma. *Aging Dis.* **3**, 280–290 (2012).
 139. Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat. Immunol.* **14**, 428–436 (2013).
 140. Coder, B. D., Wang, H., Ruan, L. & Su, D.-M. Thymic involution perturbs negative selection leading to autoreactive T cells that induce chronic inflammation. *J. Immunol.* **194**, 5825–5837 (2015).
 141. Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Immune aging and autoimmunity. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 1615–1623 (2012).
 142. Miller, F. W. *et al.* Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: Findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *Journal of Autoimmunity* **39**, 259–271 (2012).
 143. Linton, P. J. & Dorshkind, K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* **5**, 133–139 (2004).
 144. Moro-García, M. A. *et al.* Molecular mechanisms involved in the aging of the T-cell immune response. *Curr. Genomics* **13**, 589–602 (2012).
 145. Akbar, A. N. & Henson, S. M. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 289–295

- (2011).
146. Hohensinner, P. J., Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Telomere dysfunction, autoimmunity and aging. *Aging Dis.* **2**, 524–537 (2011).
 147. Mitchell, W. A., Lang, P. O. & Aspinall, R. Tracing thymic output in older individuals. *Clin. Exp. Immunol.* **161**, 497–503 (2010).
 148. Perry, H. M. The endocrinology of aging. in *Clinical Chemistry* **45**, 1369–1376 (1999).
 149. Ferrari, E. *et al.* Pineal and pituitary-adrenocortical function in physiological aging and in senile dementia. in *Experimental Gerontology* **35**, 1239–1250 (2000).
 150. Jaffe, H. L. The influence of the suprarenal gland on the thymus. *J. Exp. Med.* **40**, 619–625 (1924).
 151. Purton, J. F. *et al.* Expression of the glucocorticoid receptor from the 1A promoter correlates with T lymphocyte sensitivity to glucocorticoid-induced cell death. *J. Immunol.* **173**, 3816–3824 (2004).
 152. Steinmann, G. G., Klaus, B. & Müller-Hermelink, H. -K. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty: A morphometric study. *Scand. J. Immunol.* **22**, 563–575 (1985).
 153. Tibbetts, T. A., DeMayo, F., Rich, S., Conneely, O. M. & O'Malley, B. W. Progesterone receptors in the thymus are required for thymic involution during pregnancy and for normal fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12021–12026 (1999).
 154. Rode, I. & Boehm, T. Regenerative capacity of adult cortical thymic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 3463–3468 (2012).
 155. Dumont-Lagacé, M., St-Pierre, C. & Perreault, C. Sex hormones have pervasive effects on thymic epithelial cells. *Sci. Rep.* **5**, 12895 (2015).
 156. Velardi, E. *et al.* Sex steroid blockade enhances thymopoiesis by modulating Notch signaling. *J. Exp. Med.* **211**, 2341–2349 (2014).
 157. Olsen, N. J., Olson, G., Viselli, S. M., Gu, X. & Kovacs, W. J. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology* **142**, 1278–1283 (2001).
 158. Lai, K.-P. *et al.* Targeting thymic epithelia AR enhances T-cell reconstitution and

- bone marrow transplant grafting efficacy. *Mol. Endocrinol.* **27**, 25–37 (2013).
159. Dudakov, J. A. *et al.* Sex steroid ablation enhances hematopoietic recovery following cytotoxic antineoplastic therapy in Aged mice. *J. Immunol.* **183**, 7084–7094 (2009).
 160. Griffith, A. V., Fallahi, M., Venables, T. & Petrie, H. T. Persistent degenerative changes in thymic organ function revealed by an inducible model of organ regrowth. *Aging Cell* **11**, 169–177 (2012).
 161. Zoller, A. L. & Kersh, G. J. Estrogen induces thymic atrophy by eliminating early thymic progenitors and inhibiting proliferation of beta-selected thymocytes. *J. Immunol.* **176**, 7371–7378 (2006).
 162. Rijhsinghani, A. G., Thompson, K., Bhatia, S. K. & Waldschmidt, T. J. Estrogen blocks early T cell development in the thymus. *Am. J. Reprod. Immunol.* **36**, 269–277 (1996).
 163. Murphy, W. J., Durum, S. K., Anver, M. R. & Longo, D. L. Immunologic and hematologic effects of neuroendocrine hormones. Studies on DW/J dwarf mice. *J. Immunol.* **148**, 3799–3805 (1992).
 164. Redelman, D., Welniak, L. A., Taub, D. & Murphy, W. J. Neuroendocrine hormones such as growth hormone and prolactin are integral members of the immunological cytokine network. *Cellular Immunology* **252**, 111–121 (2008).
 165. Chen, B. J., Cui, X., Sempowski, G. D. & Chao, N. J. Growth hormone accelerates immune recovery following allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation in mice. *Exp. Hematol.* **31**, 953–958 (2003).
 166. de Mello-Coelho, V. Growth hormone and its receptor are expressed in human thymic cells. *Endocrinology* **139**, 3837–3842 (1998).
 167. Youm, Y. H. *et al.* Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity. *J. Biol. Chem.* **284**, 7068–7077 (2009).
 168. Dixit, V. D. *et al.* Ghrelin promotes thymopoiesis during aging. *J. Clin. Invest.* **117**, 2778–2790 (2007).
 169. Taub, D. D., Murphy, W. J. & Longo, D. L. Rejuvenation of the aging thymus: Growth hormone-mediated and ghrelin-mediated signaling pathways. *Current*

- Opinion in Pharmacology* **10**, 408–424 (2010).
170. Gruver, A. L., Ventevogel, M. S. & Sempowski, G. D. Leptin receptor is expressed in thymus medulla and leptin protects against thymic remodeling during endotoxemia-induced thymus involution. *J. Endocrinol.* **203**, 75–85 (2009).
 171. Sreenivasan, J., Schlenner, S., Franckaert, D., Dooley, J. & Liston, A. The thymoprotective function of leptin is indirectly mediated via suppression of obesity. *Immunology* **146**, 122–129 (2015).
 172. Velloso, L. A., Savino, W. & Mansour, E. Leptin action in the thymus. in *Annals of the New York Academy of Sciences* **1153**, 29–34 (2009).
 173. Tchkonina, T. *et al.* Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* **9**, 667–684 (2010).
 174. Haynes, L. & Swain, S. L. Why aging T cells fail: Implications for vaccination. *Immunity* **24**, 663–666 (2006).
 175. Tyan, M. L. Age-related decrease in mouse T cell progenitors. *J. Immunol. (Baltimore, Md 1950)* **118**, 846–851 (1977).
 176. Donnini, A., Re, F., Orlando, F. & Provinciali, M. Intrinsic and microenvironmental defects are involved in the age-related changes of Lin-c-kit⁺ hematopoietic progenitor cells. *Rejuvenation Res.* **10**, 459–472 (2007).
 177. Doria, G., Mancini, C., Utsuyama, M., Frasca, D. & Hirokawa, K. Aging of the recipients but not of the bone marrow donors enhances autoimmunity in syngeneic radiation chimeras. *Mech. Ageing Dev.* **95**, 131–142 (1997).
 178. Mackall, C. L., Punt, J. A., Morgan, P., Farr, A. G. & Gress, R. E. Thymic function in young/old chimeras: Substantial thymic T cell regenerative capacity despite irreversible age-associated thymic involution. *Eur. J. Immunol.* **28**, 1886–1893 (1998).
 179. Zhu, X. *et al.* Lymphohematopoietic progenitors do not have a synchronized defect with age-related thymic involution. *Aging Cell* **6**, 663–672 (2007).
 180. Gui, J. *et al.* The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *Int. Immunol.* **19**, 1201–1211 (2007).
 181. Kim, M.-J., Miller, C. M., Shadrach, J. L., Wagers, A. J. & Serwold, T. Young,

- proliferative thymic epithelial cells engraft and function in aging thymuses. *J. Immunol.* **194**, 4784–4795 (2015).
182. Rodriguez-Puebla, M. L. *et al.* Cyclin D2 overexpression in transgenic mice induces thymic and epidermal hyperplasia whereas cyclin D3 expression results only in epidermal hyperplasia. *Am. J. Pathol.* **157**, 1039–1050 (2000).
 183. Scheijen, B., Bronk, M., van der Meer, T., De Jong, D. & Bernards, R. High incidence of thymic epithelial tumors in E2F2 transgenic mice. *J Biol Chem* **279**, 10476–10483 (2004).
 184. Garfin, P. M. *et al.* Inactivation of the RB family prevents thymus involution and promotes thymic function by direct control of Foxn1 expression. *J. Exp. Med.* **210**, 1087–1097 (2013).
 185. Robles, A. I. *et al.* Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7634–7638 (1996).
 186. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
 187. Dumont-Lagacé, M., Brochu, S., St-Pierre, C. & Perreault, C. Adult thymic epithelium contains nonsenescent label-retaining cells. *J. Immunol.* **192**, 2219–2226 (2014).
 188. Fletcher, A. L. *et al.* Ablation and regeneration of tolerance-inducing medullary thymic epithelial cells after cyclosporine, cyclophosphamide, and dexamethasone treatment. *J. Immunol.* **183**, 823–831 (2009).
 189. Metzger, T. C. *et al.* Lineage tracing and cell ablation identify a post-aire-expressing thymic epithelial cell population. *Cell Rep.* **5**, 166–179 (2013).
 190. St-Pierre, C. *et al.* Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci. Rep.* **3**, 1860 (2013).
 191. Ki, S. *et al.* Global transcriptional profiling reveals distinct functions of thymic stromal subsets and age-related changes during thymic involution. *Cell Rep.* **9**, 402–415 (2014).
 192. Meireles, C. *et al.* Thymic crosstalk restrains the pool of cortical thymic epithelial cells with progenitor properties. *Eur. J. Immunol.* **47**, 958–969 (2017).

193. Sekai, M., Hamazaki, Y. & Minato, N. Medullary thymic epithelial stem cells maintain a functional thymus to ensure lifelong central T cell tolerance. *Immunity* **41**, 753–761 (2014).
194. Wilson, A. *et al.* Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **135**, 1118–1129 (2008).
195. Dooley, J. & Liston, A. Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *European Journal of Immunology* **42**, 1073–1079 (2012).
196. Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J. & Scollay, R. The generation and fate of thymocytes. *Semin.Immunol.* **2**, 3–12 (1990).
197. Li, L. *et al.* Cellular mechanism of thymic involution. *Scand. J. Immunol.* **57**, 410–422 (2003).
198. Zamzami, N. *et al.* Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* **182**, 367–377 (1995).
199. Konkel, J. E., Jin, W., Abbatiello, B., Grainger, J. R. & Chen, W. Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E465–E473 (2014).
200. Calvo-Asensio, I., Barthlott, T., von Muenchow, L., Lowndes, N. F. & Ceredig, R. Differential response of mouse thymic epithelial cell types to ionizing radiation-induced DNA damage. *Front. Immunol.* **8**, 418 (2017).
201. Ishikawa, K., Ishii, H. & Saito, T. DNA damage-dependent cell cycle checkpoints and genomic stability. *DNA Cell Biol.* **25**, 406–411 (2006).
202. Rodrigues, P. M. *et al.* Thymic epithelial cells require p53 to support their long-term function in thymopoiesis in mice. *Blood* **130**, 478–488 (2017).
203. Griffith, A. V. *et al.* Metabolic damage and premature thymus aging caused by stromal catalase deficiency. *Cell Rep.* **12**, 1071–1079 (2015).
204. Ulyanchenko, S. *et al.* Identification of a bipotent epithelial progenitor population in the adult thymus. *Cell Rep.* **14**, 2819–2832 (2016).
205. Wong, K. *et al.* Multilineage potential and self-renewal define an epithelial progenitor cell population in the adult thymus. *Cell Rep.* **8**, 1198–1209 (2014).

206. Behrens, A., van Deursen, J. M., Rudolph, K. L. & Schumacher, B. Impact of genomic damage and ageing on stem cell function. *Nat. Cell Biol.* **16**, 201–207 (2014).
207. Fraga, M. F. Genetic and epigenetic regulation of aging. *Current Opinion in Immunology* **21**, 446–453 (2009).
208. Sedivy, J. M., Banumathy, G. & Adams, P. D. Aging by epigenetics-A consequence of chromatin damage? *Experimental Cell Research* **314**, 1909–1917 (2008).
209. Berdasco, M. & Esteller, M. Hot topics in epigenetic mechanisms of aging: 2011. *Aging Cell* **11**, 181–186 (2012).
210. Bredenkamp, N., Nowell, C. S. & Blackburn, C. C. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development* **141**, 1627–1637 (2014).
211. Yuan, S. *et al.* Post-transcriptional regulation of keratinocyte progenitor cell expansion, differentiation and hair follicle regression by miR-22. *PLoS Genet.* **11**, e1005253 (2015).
212. Hoover, A. R. *et al.* MicroRNA-205 maintains T cell development following stress by regulating forkhead box N1 and selected chemokines. *J. Biol. Chem.* **291**, 23237–23247 (2016).
213. Belkaya, S. *et al.* Dynamic modulation of thymic microRNAs in response to stress. *PLoS One* **6**, e27580 (2011).
214. Kushwaha, R., Thodima, V., Tomishima, M. J., Bosl, G. J. & Chaganti, R. S. K. miR-18b and miR-518b target FOXP1 during epithelial lineage differentiation in pluripotent cells. *Stem Cells Dev.* **23**, 1149–1156 (2014).
215. Xu, M., Sizova, O., Wang, L. & Su, D.-M. A fine-tune role of mir-125a-5p on Foxp1 during age-associated changes in the thymus. *Aging Dis.* **8**, 277–286 (2017).
216. Reis, M. D. D. S. *et al.* Decline of FOXP1 gene expression in human thymus correlates with age: possible epigenetic regulation. *Immun. Ageing* **12**, 18 (2015).
217. Jackson, S. J. *et al.* Rapid and widespread suppression of self-renewal by microRNA-203 during epidermal differentiation. *Development* **140**, 1882–1891 (2013).
218. Lena, A. M. *et al.* miR-203 represses ‘stemness’ by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ.* **15**, 1187–1195 (2008).

219. Min, D. *et al.* Sustained thymopoiesis and improvement in functional immunity induced by exogenous KGF administration in murine models of aging. *Blood* **109**, 2529–2537 (2007).
220. Revest, J. M., Suniara, R. K., Kerr, K., Owen, J. J. & Dickson, C. Development of the thymus requires signaling through the fibroblast growth factor receptor R2-IIIb. *J. Immunol.* **167**, 1954–1961 (2001).
221. Jenkinson, W. E., Jenkinson, E. J. & Anderson, G. Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *J. Exp. Med.* **198**, 325–332 (2003).
222. Youm, Y.-H., Horvath, T. L., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. A. & Dixit, V. D. Prolongevity hormone FGF21 protects against immune senescence by delaying age-related thymic involution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 1026–1031 (2016).
223. Chu, Y.-W. *et al.* Exogenous insulin-like growth factor 1 enhances thymopoiesis predominantly through thymic epithelial cell expansion. *Blood* **112**, 2836–2846 (2008).
224. Heinonen, K. M., Vanegas, J. R., Lew, D., Krosi, J. & Perreault, C. Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway. *PLoS One* **6**, e19279 (2011).
225. Hong, C., Luckey, M. A. & Park, J. H. Intrathymic IL-7: The where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development. *Seminars in Immunology* **24**, 151–158 (2012).
226. Lannes-Vleira, J. *et al.* Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. III. Thymic epithelial cells express the VLA6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. *Int. Immunol.* **5**, 1421–1430 (1993).
227. Kutlesa, S. *et al.* E-cadherin-mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103⁺ thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation. *J. Cell Sci.* **115**, 4505–4515 (2002).
228. Salomon, D. *et al.* Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood* **89**, 2461–2471 (1997).

229. Ocampo, J. S. P. *et al.* Laminin-211 controls thymocyte-thymic epithelial cell interactions. *Cell. Immunol.* **254**, 1–9 (2008).
230. Emre, Y. *et al.* Thymic epithelial cell expansion through matricellular protein CYR61 boosts progenitor homing and T-cell output. *Nat. Commun.* **4**, 2842 (2013).
231. Kular, J. K., Basu, S. & Sharma, R. I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J. Tissue Eng.* **5**, 1–17 (2014).
232. Osada, M., Singh, V. J., Wu, K., Sant'angelo, D. B. & Pezzano, M. Label retention identifies a multipotent mesenchymal stem cell-like population in the postnatal thymus. *PLoS One* **8**, e83024 (2013).
233. Vandanmagsar, B. *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* **17**, 179–188 (2011).
234. Mariathasan, S. *et al.* Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**, 213–218 (2004).
235. Latz, E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Current Opinion in Immunology* **22**, 28–33 (2010).
236. Youm, Y. H. *et al.* The NLRP3 inflammasome promotes age-related thymic demise and immunosenescence. *Cell Rep.* **1**, 56–68 (2012).
237. St-Pierre, C. *et al.* Immunoproteasomes control the homeostasis of medullary thymic epithelial cells by alleviating proteotoxic stress. *Cell Rep.* **21**, 2558–2570 (2017).
238. Kafri, M., Metzl-Raz, E., Jona, G. & Barkai, N. The cost of protein production. *Cell Rep.* **14**, 22–31 (2016).
239. Yang, H., Youm, Y.-H. & Dixit, V. D. Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution. *J. Immunol.* **183**, 3040–3052 (2009).
240. Buszczak, M., Signer, R. A. & Morrison, S. J. Cellular differences in protein synthesis regulate tissue homeostasis. *Cell* **159**, 242–251 (2014).
241. Wang, H.-X. *et al.* mTORC1 in thymic epithelial cells is critical for thymopoiesis, T-cell generation, and temporal control of $\gamma\delta$ T17 development and TCR γ/δ recombination. *PLOS Biol.* **14**, e1002370 (2016).
242. Wang, H.-X., Cheng, J. S., Chu, S., Qiu, Y.-R. & Zhong, X.-P. mTORC2 in thymic

- epithelial cells controls thymopoiesis and T cell development. *J. Immunol.* **197**, 141–150 (2016).
243. Garfin, P. M., Nguyen, T. & Sage, J. Loss of Pten disrupts the thymic epithelium and alters thymic function. *PLoS One* **11**, e0149430 (2016).
 244. Harper, J. W. & Bennett, E. J. Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance. *Nature* **537**, 328–338 (2016).
 245. Eisele, Y. S. *et al.* Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 759–780 (2015).
 246. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Proteostasis and aging. *Nat. Med.* **21**, 1406–1415 (2015).
 247. Hetz, C., Chevet, E. & Oakes, S. A. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat. Cell Biol.* **17**, 829–838 (2015).
 248. Milićević, N. M., Nohroudi, K., Milićević, Ž. & Westermann, J. Activation of cortical and inhibited differentiation of medullary epithelial cells in the thymus of lymphotoxin-beta receptor-deficient mice: An ultrastructural study. *J. Anat.* **212**, 114–124 (2008).
 249. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 89–102 (2012).
 250. Frakes, A. E. & Dillin, A. The UPR ER : Sensor and Coordinator of Organismal Homeostasis. *Mol. Cell* **66**, 761–771 (2017).
 251. George, A. J. T. & Ritter, M. A. Thymic involution with ageing: Obsolescence or good housekeeping? *Immunology Today* **17**, 267–272 (1996).
 252. Howard, J. K. *et al.* Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J. Clin. Invest.* **104**, 1051–1059 (1999).
 253. Kendall, M. D. & Clarke, A. G. The thymus in the mouse changes its activity during pregnancy : a study of the microenvironment. *J. Anat* **197**, 393–411 (2000).
 254. Offner, F., Kerre, T., De Smedt, M. & Plum, J. Bone marrow CD34+ cells generate fewer T cells in vitro with increasing age and following chemotherapy. *Br. J. Haematol.* **104**, 801–808 (1999).
 255. Martins, V. C. *et al.* Thymus-autonomous T cell development in the absence of

- progenitor import. *J. Exp. Med.* **209**, 1409–1417 (2012).
256. Martins, V. C. *et al.* Cell competition is a tumour suppressor mechanism in the thymus. *Nature* **509**, 465–470 (2014).
 257. Liu, Y. *et al.* Expression of p16INK4a prevents cancer and promotes aging in lymphocytes. *Blood* **117**, 3257–3267 (2011).
 258. Chaudhry, M. S., Velardi, E., Dudakov, J. A. & van den Brink, M. R. M. Thymus : the next (re) generation. **271**, 56–71 (2016).
 259. Mackall, C. L. T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review. *Stem Cells* **18**, 10–18 (2000).
 260. Savino, W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathogens* **2**, e62 (2006).
 261. Papadopoulou, A. S. *et al.* The thymic epithelial microRNA network elevates the threshold for infection-associated thymic involution via miR-29a mediated suppression of the IFN- α receptor. *Nat. Immunol.* **13**, 181–187 (2011).
 262. Krenger, W. & Holländer, G. A. The immunopathology of thymic GVHD. *Seminars in Immunopathology* **30**, 439–456 (2008).
 263. Blazar, B. R., Murphy, W. J. & Abedi, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 443–458 (2012).
 264. Montecino-Rodriguez, E., Min, H. & Dorshkind, K. Reevaluating current models of thymic involution. *Seminars in Immunology* **17**, 356–361 (2005).
 265. Yano, M. *et al.* Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J. Exp. Med.* **205**, 2827–2838 (2008).
 266. Hubert, F.-X. *et al.* Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* **118**, 2462–2472 (2011).
 267. Gray, D., Abramson, J., Benoist, C. & Mathis, D. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J. Exp. Med.* **204**, 2521–2528 (2007).
 268. Dooley, J., Erickson, M. & Farr, A. G. Alterations of the medullary epithelial compartment in the Aire-deficient thymus: implications for programs of thymic epithelial differentiation. *J. Immunol.* **181**, 5225–5232 (2008).

269. Colomé, N. *et al.* Increased apoptosis after autoimmune regulator expression in epithelial cells revealed by a combined quantitative proteomics approach. *J. Proteome Res.* **9**, 2600–2609 (2010).
270. Meloni, A. *et al.* DAXX is a new AIRE-interacting protein. *J. Biol. Chem.* **285**, 13012–13021 (2010).
271. Wang, S. & Kaufman, R. J. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J. Cell Biol.* **197**, 857–867 (2012).
272. Nogueira, V. & Hay, N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin. cancer Res.* **19**, 4309–4314 (2013).
273. Salomons, F. A. *et al.* Selective accumulation of aggregation-prone proteasome substrates in response to proteotoxic stress. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1774–1785 (2009).
274. Oromendia, A. B., Dodgson, S. E. & Amon, A. Aneuploidy causes proteotoxic stress in yeast. *Genes Dev.* **26**, 2696–2708 (2012).
275. Holmberg, J. & Perlmann, T. Maintaining differentiated cellular identity. *Nature Reviews Genetics* **13**, 429–439 (2012).
276. Yewdell, J. W. DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends in Immunology* **32**, 548–558 (2011).
277. Rock, Kenneth L., Farfan-Arribas Diego J., Colbert Jeff D., G. A. L. . MHC class I-presented peptides and the DRiP hypothesis. *Trends Immunol.* **35**, 144–152 (2014).
278. Keane, P., Ceredig, R. & Seoighe, C. Promiscuous mRNA splicing under the control of AIRE in medullary thymic epithelial cells. *Bioinformatics* **31**, 986–990 (2014).
279. Ghazalpour, A. *et al.* Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet.* **7**, e1001393 (2011).
280. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. & Aebersold, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1720–1730 (1999).
281. Pascal, L. E. *et al.* Correlation of mRNA and protein levels: Cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics* **9**, 246 (2008).
282. Rieckmann, J. C. *et al.* Social network architecture of human immune cells unveiled by quantitative proteomics. *Nat. Immunol.* **18**, 583–593 (2017).

283. Chen, G. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 304–313 (2002).
284. Pearson, H. Perreault, C. MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. *J. Clin. Invest.* **126**, 4690–4701 (2016).
285. Ingolia, N. T. Ribosome profiling: New views of translation, from single codons to genome scale. *Nature Reviews Genetics* **15**, 205–213 (2014).
286. Fortier, M.-H. *et al.* The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J. Exp. Med.* **205**, 595–610 (2008).
287. Granados, D. P. *et al.* Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nat. Commun.* **5**, 3600 (2014).
288. Laumont, C. M. *et al.* Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames. *Nat. Commun.* **7**, 10238 (2016).
289. Eysteinsdottir, J. H. *et al.* The influence of partial or total thymectomy during open heart surgery in infants on the immune function later in life. *Clin. Exp. Immunol.* **136**, 349–355 (2004).
290. Roosen, J., Oosterlinck, W. & Meyns, B. Routine thymectomy in congenital cardiac surgery changes adaptive immunity without clinical relevance. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **20**, 101–106 (2015).
291. Afifi, A., Raja, S. G., Pennington, D. J. & Tsang, V. T. For neonates undergoing cardiac surgery does thymectomy as opposed to thymic preservation have any adverse immunological consequences? *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **11**, 287–291 (2010).
292. Seino, S., Shibasaki, T. & Minami, K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 2118–2125 (2011).
293. Cornejo, V. H., Pihán, P., Vidal, R. L. & Hetz, C. Role of the unfolded protein response in organ physiology: Lessons from mouse models. *IUBMB Life* **65**, 962–975 (2013).
294. Brozzi, F. *et al.* A combined ‘omics’ approach identifies NMI as a novel cytokine-induced regulator of IRE1 α and JNK in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* **289**,

- 20677–20693 (2014).
295. Liston, A., Todd, J. A. & Lagou, V. Beta-cell fragility as a common underlying risk factor in type 1 and type 2 diabetes. *Trends in Molecular Medicine* **23**, 181–194 (2017).
 296. Qiu, Y. *et al.* A crucial role for RACK1 in the regulation of glucose-stimulated IRE1 α activation in pancreatic beta cells. *Sci Signal* **3**, ra7 (2010).
 297. Lipson, K. L. *et al.* Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab.* **4**, 245–254 (2006).
 298. Jurkin, J. *et al.* The mammalian tRNA ligase complex mediates splicing of XBP1 mRNA and controls antibody secretion in plasma cells. *EMBO J.* **33**, 2922–2936 (2014).
 299. Reimold, A. M. *et al.* Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **412**, 300–307 (2001).
 300. Morimoto, R. I. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes and Development* **22**, 1427–1438 (2008).
 301. Aichinger, M., Wu, C., Nedjic, J. & Klein, L. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. *J. Exp. Med.* **210**, 287–300 (2013).
 302. Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N. & Klein, L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* **455**, 396–400 (2008).
 303. Goldberg, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**, 895–899 (2003).
 304. Glickman, M. H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**, 373–428 (2002).
 305. Finley, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 477–513 (2009).
 306. Aki, M. *et al.* Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J. Biochem.* **115**, 257–269 (1994).

307. Basler, M., Kirk, C. J. & Groettrup, M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Current Opinion in Immunology* **25**, 74–80 (2013).
308. Osterloh, P. *et al.* Proteasomes shape the repertoire of T cells participating in antigen-specific immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5042–5047 (2006).
309. Dalet, A., Stroobant, V., Vigneron, N. & Van Den Eynde, B. J. Differences in the production of spliced antigenic peptides by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Eur. J. Immunol.* **41**, 39–46 (2011).
310. de Verteuil, D. *et al.* Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 2034–2047 (2010).
311. Kincaid, E. Z. *et al.* Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat. Immunol.* **13**, 129–135 (2011).
312. Pickering, A. M. *et al.* The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$ proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem. J.* **432**, 585–594 (2010).
313. Yun, Y. S. *et al.* mTORC1 coordinates protein synthesis and immunoproteasome formation via PRAS40 to prevent accumulation of protein stress. *Mol. Cell* **61**, 625–639 (2016).
314. Seifert, U. *et al.* Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* **142**, 613–624 (2010).
315. Xing, Y., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Thymoproteasome subunit- β 5T generates peptide-MHC complexes specialized for positive selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 6979–6984 (2013).
316. Sasaki, K. *et al.* Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8⁺ T cells. *Nat. Commun.* **6**, 7484 (2015).
317. Takada, K. *et al.* TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **10**, 1069–1076 (2015).

318. Nitta, T. *et al.* Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity* **32**, 29–40 (2010).
319. Hu, Z., Lancaster, J. N. & Ehrlich, L. I. R. The contribution of chemokines and migration to the induction of central tolerance in the thymus. *Front. Immunol.* **6**, 398 (2015).
320. Griffin, T. A. *et al.* Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J. Exp. Med.* **187**, 97–104 (1998).
321. de Verteuil, D. A. *et al.* Immunoproteasomes shape the transcriptome and regulate the function of dendritic cells. *J. Immunol.* **193**, 1121–1132 (2014).
322. Fabre, B. *et al.* Deciphering preferential interactions within supramolecular protein complexes: the proteasome case. *Mol. Syst. Biol.* **11**, 771 (2015).
323. Li, J., Powell, S. R. & Wang, X. Enhancement of proteasome function by PA28alpha overexpression protects against oxidative stress. *Faseb J* **25**, 883–893 (2011).
324. Weih, F. *et al.* Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel family. *Cell* **80**, 331–340 (1995).
325. Johnston-Carey, H. K., Pomatto, L. C. D. & Davies, K. J. A. The Immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**, 268–281 (2016).
326. Gomes, A. V. Genetics of proteasome diseases. *Scientifica (Cairo)*. **2013**, 637629 (2013).
327. Kitamura, A. *et al.* A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J. Clin. Invest.* **121**, 4150–4160 (2011).
328. Muchamuel, T. *et al.* A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat. Med.* **15**, 781–787 (2009).
329. Rockwell, C. E., Monaco, J. J. & Qureshi, N. A critical role for the inducible proteasomal subunits LMP7 and MECL1 in cytokine production by activated murine splenocytes. *Pharmacology* **89**, 117–126 (2012).

330. Liu, Y. *et al.* Mutations in proteasome subunit β type 8 cause chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature with evidence of genetic and phenotypic heterogeneity. *Arthritis Rheum.* **64**, 895–907 (2012).
331. Arima, K. *et al.* Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14914–14919 (2011).
332. Cui, Z., Hwang, S. M. & Gomes, A. V. Identification of the immunoproteasome as a novel regulator of skeletal muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 96–109 (2014).
333. Atkinson, S. P. *et al.* A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **30**, 1373–1384 (2012).
334. Ferrington, D. A. *et al.* Immunoproteasome responds to injury in the retina and brain. *J. Neurochem.* **106**, 158–169 (2008).
335. Rouette, A. *et al.* Expression of immunoproteasome genes is regulated by cell-intrinsic and –extrinsic factors in human cancers. *Sci. Rep.* **6**, 34019 (2016).
336. Yamada, K. *et al.* Thymic transplantation in miniature swine: I. Development and function of the ‘thymokidney’. *Transplantation* **68**, 1684–1692 (1999).
337. Chen, L. *et al.* Construction and functional evaluation of an autologous thymokidney model in the rat. *Transplant. Proc.* **39**, 3409–3414 (2007).
338. Lambrigts, D. *et al.* Development of thymus autografts under the kidney capsule in the pig: A new ‘organ’ for xenotransplantation. *Xenotransplantation* **3**, 296–303 (1996).
339. Markert, M. L. *et al.* Review of 54 patients with complete DiGeorge anomaly enrolled in protocols for thymus transplantation: Outcome of 44 consecutive transplants. *Blood* **109**, 4539–4547 (2007).
340. Rice, H. E. *et al.* Thymic transplantation for complete DiGeorge syndrome: Medical and surgical considerations. *Journal of Pediatric Surgery* **39**, 1607–1615 (2004).
341. Markert, M. L., Devlin, B. H., Chinn, I. K. & McCarthy, E. A. Thymus transplantation in complete DiGeorge anomaly. *Immunologic Research* **44**, 61–70 (2009).
342. Markert, M. L. *et al.* Use of allograft biopsies to assess thymopoiesis after thymus

- transplantation. *J Immunol (Baltimore, Md.)* **180**, 6354–6364 (2008).
343. Friesen, E. L., De Snoo, M. L., Rajendran, L., Kalia, L. V. & Kalia, S. K. Chaperone-based therapies for disease modification in Parkinson's disease. *Parkinsons. Dis.* **2017**, 5015307 (2017).
 344. Park, S. W. & Ozcan, U. Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Seminars in Immunopathology* **35**, 351–373 (2013).
 345. Vang, S., Longley, K., Steer, C. J. & Low, W. C. The unexpected uses of urso- and tauroursodeoxycholic acid in the treatment of non-liver diseases. *Glob. Adv. Heal. Med.* **3**, 58–69 (2014).
 346. Leestemaker, Y. *et al.* Proteasome activation by small molecules. *Cell Chem. Biol.* **24**, 725–736.e7 (2017).
 347. Nowak, J. A. & Fuchs, E. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **482**, 215–232 (2009).
 348. Tudor, D., Chaudry, F., Harper, L. & Mackenzie, I. C. The in vitro behaviour and patterns of colony formation of murine epithelial stem cells. *Cell Prolif.* **40**, 706–720 (2007).
 349. Ohigashi, I. *et al.* Adult thymic medullary epithelium is maintained and regenerated by lineage-restricted cells rather than bipotent progenitors. *Cell Rep.* **13**, 1432–1443 (2015).
 350. Snippert, H. J. & Clevers, H. Tracking adult stem cells. *EMBO Reports* **12**, 113–122 (2011).
 351. Foudi, A. *et al.* Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **27**, 84–90 (2009).
 352. Biteau, B., Hochmuth, C. E. & Jasper, H. Maintaining tissue homeostasis: Dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell Stem Cell* **9**, 402–411 (2011).
 353. Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology* **192**, 547–556 (2011).
 354. Osowski, C. M. & Urano, F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* **490**, 71–92 (2011).
 355. Suurväli, J. *et al.* The proto-MHC of placozoans, a region specialized in cellular stress and ubiquitination/proteasome pathways. *J. Immunol.* **193**, 2891–2901 (2014).

356. Dantuma, N. P. & Bott, L. C. The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 70 (2014).
357. Díaz-Hernández, M. *et al.* Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J. Neurosci.* **23**, 11653–11661 (2003).
358. Mishto, M. *et al.* Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol. Aging* **27**, 54–66 (2006).
359. Cheroni, C. *et al.* Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 82–96 (2009).
360. Xu, D. *et al.* Phosphorylation and activation of ubiquitin-specific protease-14 by Akt regulates the ubiquitin-proteasome system. *Elife* **4**, e10510 (2015).
361. Lee, B.-H. *et al.* Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* **467**, 179–184 (2010).
362. Kaur, G. & Batra, S. Emerging role of immunoproteasomes in pathophysiology. *Immunology and Cell Biology* **94**, 812–820 (2016).
363. Saez, I. & Vilchez, D. The mechanistic links between proteasome activity, aging and age-related diseases. *Curr. Genomics* **15**, 38–51 (2014).
364. Li, J. *et al.* NEDD8 Ultimate Buster 1 Long (NUB1L) protein suppresses atypical neddylation and promotes the proteasomal degradation of misfolded proteins. *J. Biol. Chem.* **290**, 23850–23862 (2015).
365. Alliot, J. *et al.* The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *Journals Gerontol. Ser. A* **57**, B312–B320 (2002).
366. Moyse, E., Arseneault, M., Gaudreau, P., Ferland, G. & Ramassamy, C. Gender- and region-dependent changes of redox biomarkers in the brain of successfully aging LOU/C rats. *Mech. Ageing Dev.* **149**, 19–30 (2015).
367. Moreau, P. *et al.* Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 Years later. *Blood* **120**, 947–959 (2012).
368. Lin, J.-T. *et al.* Regulation of feedback between protein kinase A and the proteasome system worsens Huntington's disease. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 1073–1084 (2013).
369. Liu, Y. *et al.* Sulforaphane enhances proteasomal and autophagic activities in mice

and is a potential therapeutic reagent for Huntington's disease. *J. Neurochem.* **129**, 539–547 (2014).

370. Myeku, N. *et al.* Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. *Nat. Med.* **22**, 46–53 (2016).